

# Steigerung des immunogenen Potentials einer HPV16-E7SH-DNA-Vakzine

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Stefan Heymel  
geboren am 14.01.1980 in Schmalkalden**

**Gutachter:**

1. ....

2. ....

3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung: .....**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Das Zervixkarzinom.....	3
2.2 Humane Papillomaviren.....	5
2.3 Das Genom der Humanen Papillomaviren.....	6
2.4 Die frühen Proteine der Papillomaviren (E1 - E7).....	7
2.5 Die späten Proteine der Papillomaviren.....	10
2.6 Die Immunantwort nach einer HPV-Infektion.....	11
2.7 Ansätze für eine therapeutische und prophylaktische HPV-Vakzinierung.....	14
2.8 Zielstellung der Arbeit.....	17
<b>3. Methoden.....</b>	<b>19</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	19
3.1.1 Restriktionsverdau.....	19
3.1.2 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen.....	19
3.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Kit.....	20
3.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA.....	20
3.1.5 Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden.....	20
3.1.6 Ligation linearer DNA-Fragmente.....	21
3.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	21
3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien zur Transformation durch Elektroporation.....	22
3.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien zur chemischen Transformation.....	22
3.1.10 Bakterielle Transformation durch Elektroporation.....	22
3.1.11 Chemische bakterielle Transformation.....	23
3.1.12 Plasmidschnellaufarbeitung (Plasmid-DNA-Minipräparation).....	23
3.1.13 Plasmidgroßaufarbeitung (Plasmid-DNA-Maxipräparation).....	24
3.1.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
3.1.15 Amplifizierung der HPV16-E7SH-, IL-2-, GM-CSF- und IFN- $\gamma$ -Gene.....	25
3.1.16 Transkriptionsnachweis mittels PCR.....	26
3.2 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA.....	27
3.2.1 RNA-Extraktion aus transfizierten murinen Tumorzellen mittels TRIzol-Reagent...	27
3.2.2 Gelelektrophorese von RNA in Agarosegelen.....	27
3.2.3 Northern Blot.....	28
3.2.3.1 Der Blotvorgang.....	28
3.2.3.2 Radioaktive Markierung der Sonden-DNA mit $\alpha^{32}$ -dATP.....	28

3.2.3.3 RNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde.....	29
3.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	30
3.3 Arbeiten mit Proteinen.....	31
3.3.1 Proteinextraktion.....	31
3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	32
3.3.3 Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgel.....	32
3.3.4 Western Blot.....	33
3.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	34
3.3.6 Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen.....	34
3.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	35
3.4.1 Kultur der Tumorzelllinien und Milzzellen.....	35
3.4.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	35
3.4.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen.....	36
3.4.4 Lebendzellzahlbestimmung.....	36
3.4.5 Transfektion durch METAFECTENE™.....	36
3.5 Tierexperimentelle Methoden.....	37
3.5.1 Anästhesie der Versuchstiere.....	37
3.5.2 Kardiotoxin-Applikation.....	37
3.5.3 DNA-Immunisierungen.....	37
3.5.4 Tumor-Regressions-Experimente.....	38
3.6 Immunologische Methoden.....	38
3.6.1 Milzentnahme und Anlegen von Milzzell-Kulturen.....	38
3.6.2 Inaktivierung der Zellen durch $\gamma$ -Bestrahlung.....	39
3.6.3 <i>In vitro</i> Restimulierung von zytotoxischen T-Zellen.....	39
3.6.4 Interferon- $\gamma$ -Elispot-Assay.....	40
3.6.5 Bestimmung der spezifischen CTL-Aktivität mittels $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay...	41
3.7 Statistische Auswertung der Tumor-Regressions-Experimente.....	43
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.1 Generierung der Immunisierungsvektoren pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ sowie pTHamp-IL-2.....	44
4.1.1 Amplifizierung der adjuvanten Gen-Konstrukte.....	44
4.1.2 Linearisierung des Expressionsvektors pTHamp.....	45
4.1.3 Präparativer Verdau der adjuvanten Gen-Konstrukte sowie des pTHamp-Vektors...	45
4.1.4 Ligation des pTHamp-Vektors mit den adjuvanten Genen GM-CSF, IFN- $\gamma$ oder IL-2.....	46
4.2 Generierung der Immunisierungsvektoren CpG50-HPV16-E7SH sowie CpG16-HPV16-E7SH.....	47

4.2.1	Amplifizierung des E7SH-Gens.....	48
4.2.2	Amplifizierung der CpG50- und CpG16-Vektoren.....	48
4.2.3	Präparativer Verdau des HPV16-E7SH-Gens und der CpG-Vektoren.....	48
4.2.4	Ligation der CpG-Vektoren mit dem HPV16-E7SH-Gen.....	49
4.3	Transkriptionsnachweis der hergestellten Konstrukte.....	50
4.3.1	Transfektion von pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ und pTHamp-IL-2 in RMA-Zellen.....	50
4.3.2	Transkriptionsnachweis mittels Reverse Transkriptase-PCR.....	50
4.3.2.1	Kontrolle der cDNA-Synthese durch Amplifikation von GAPDH.....	50
4.3.2.2	Nachweis der Transkription von pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ und pTHamp-IL-2.....	51
4.3.3	Nachweis der GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2-Transkription auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot.....	51
4.3.4	Nachweis der Proteinexpression von GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2 mittels Western Blot-Analyse.....	53
4.4	DNA-Immunisierung und Quantifizierung der induzierten Immunantwort mittels Elispot-Assay und Zytotoxizitätsassay.....	55
4.4.1	Immunisierung der Versuchstiere.....	55
4.4.2	<i>In vitro</i> Restimulierung.....	56
4.4.3	Quantifizierung des Kardiotoxin-Einsatzes.....	56
4.4.4	Quantifizierung der spezifischen zellulären Immunantwort nach Immunisierungen mit pTHamp-HPV16-E7SH in Kombination mit adjuvanten Genen.....	57
4.4.5	Quantifizierung der spezifischen zellulären Immunantwort nach Immunisierungen mit CpG50-HPV16-E7SH-DNA oder CpG16-HPV16-E7SH-DNA versus pTHamp-HPV16-E7SH-DNA.....	64
4.5	<i>In vivo</i> Tumor-Regressions-Experimente.....	68
4.5.1	Vergleich der zellulären Immunantwort bei Ko-Applikation der adjuvanten Gene GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2 zum HPV16-E7SH.....	68
4.5.2	Vergleich der Konstrukte CpG-HPV16-E7SH versus pTHamp-HPV16-E7SH in Bezug auf die Fähigkeit, eine Tumor-Regression zu induzieren.....	72
4.6	Re-Challenge mit C3-Tumorzellen.....	77
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
5.1	Potentielle Adjuvantien für die Entwicklung einer multivalenten DNA-Vakzine.....	79
5.2	Sicherheit der DNA-Vakzine und Anwendung in humanen Studien.....	81
5.3	Expressionsnachweis der adjuvanten Gene IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$ .....	82
5.4	Immunologische Vorteile der Anwendung des DNA-Adjuvants Kardiotoxin.....	82

5.5	Von den ko-applizierten adjuvanten Genen ist nur IL-2 in der Lage, eine Steigerung der Immunantwort hervorzurufen.....	83
5.6	Von den eingesetzten adjuvanten Genen ist <i>in vivo</i> nur IL-2 in der Lage, eine gesteigerte Immunantwort zu vermitteln.....	86
5.7	Von den eingesetzten Vektoren ist der Vektor CpG16 in der Lage, eine Steigerung der Immunantwort hervorzurufen.....	88
5.8	Von den eingesetzten Vektoren zeigen der pTHamp-Vektor und der CpG16-Vektor die stärkste Tumor-Regression.....	91
5.9	Re-Challenge-Tumor-Experiment.....	93
5.10	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	94
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>109</b>
7.1	Vektorkarten.....	109
7.2	Materialien.....	114
7.2.1	Biologische Materialien.....	114
7.2.1.1	Bakterienstamm (E. coli).....	114
7.2.1.2	Eukaryotische Zelllinien.....	114
7.2.1.3	Mauslinien.....	114
7.2.2	Kulturmedien.....	114
7.2.2.1	Bakterienkultur.....	114
7.2.2.2	Kultur eukaryotischer Zellen.....	114
7.2.3	Molekularbiologische, zellbiologische und immunologische Materialien.....	115
7.2.3.1	Plasmide.....	115
7.2.3.2	Synthetische Oligodesoxynukleotide (Primer).....	115
7.2.3.3	Materialien für die DNA-Auftrennung und Identifizierung im Agarosegel.....	116
7.2.3.4	Materialien für die Aufarbeitung von DNA.....	116
7.2.3.5	Plasmidschnellaufarbeitung/ Plasmidgroßaufarbeitung mittels Kit.....	116
7.2.3.5.1	Minipräparation.....	116
7.2.3.5.2	Maxipräparation mittels Kit.....	116
7.2.3.6	DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Kit.....	117
7.2.3.7	Immunisierung.....	117
7.2.3.8	Isolierung von Milzzellen.....	117
7.2.3.9	Elispot-Assay (Enzyme linked Immunospot Assay).....	117
7.2.3.10	<sup>51</sup> Chrom-Freisetzungs-Assay (Zytotoxizitätstest).....	117
7.2.3.11	Western Blot-Analyse der zellulär exprimierten adjuvanten Gene.....	117
7.2.3.12	Coomassiefärbung von Proteingelen.....	118

7.2.3.13 Materialien für RNA-Extraktion.....	118
7.2.3.13.1 RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagent.....	118
7.2.3.13.2 RNA-Extraktion mittels QIAamp® RNA Blood Mini Kit.....	118
7.2.3.14 Materialien für Northern Blot.....	119
7.2.3.15 Transfektion.....	119
7.2.3.16 Chemisch kompetente Zellen.....	119
7.2.3.17 Enzyme.....	119
7.2.3.18 Geräte.....	120
7.2.3.19 Verbrauchsmaterialien.....	121
7.2.3.20 Chemikalien.....	121
7.2.3.21 Radioisotope.....	122
Danksagung.....	123
Ehrenwörtliche Erklärung.....	124
Lebenslauf.....	125

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
$\alpha$ MEM	alpha minimal essential medium
Amp	Ampizillin
APCs	Antigen-präsentierende Zellen (antigen presenting cells)
Aqua dest	Aqua destillata, einmal destilliertes Wasser
Aqua bidest	zweimal destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BCIP/NBT-Substrat	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat/ Nitro Blau Tetrazolium
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
CEA	carcinoembryonic antigen
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CD4 <sup>+</sup> Zellen	T-Helfer-Zellen
CD8 <sup>+</sup> Zellen	zytotoxische T-Lymphozyten
CIA	Chloroform: Isoamylalkohol
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie (cervical intraepithelial neoplasia)
CIP	calf intestine alkaline phosphatase
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	Aktivität pro Minute (counts per minute)
CR	konservierte Region (conserved region)
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
CVLP	chimäre virusähnliche Partikel (chimäre virus-like-particles)
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum (Heidelberg)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	ein beliebiges 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA („double strand“)
E1-7	Produkte der frühen (early) Gene von HPV
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elispot- Assay	enzym linked immunospot assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Serum fötaler Kälber (fetal calf serum)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-Stimulierender-Faktor
h	Stunde
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	genetische Bezeichnung für MHC (human leucocyte antigen)
H <sub>2</sub> O	HPLC gereinigtes bidestilliertes Wasser
HPV	humanpathogenes Papillomavirus
HR-HPV	high risk humanes Papillomavirus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.t.	intratumoral
kDa	Kilodalton
kbp	Kilobasenpaar
KT	Kardiotoxin
kV	Kilovolt



L1, L2	Produkte der späten (late) Gene von HPV
LB-Medium	Luria Broth-Medium
LCR	long control region
LR-HPV	low risk humanes Papillomavirus
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
max.	maximal
mg	Milligramm
MGM	Molekulargewichtsmarker
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Boten-RNA (messenger-RNA)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n.d.	nicht durchgeführt, Assay wurde nicht durchgeführt
n.f.	nicht feststellbar, es wurden Tiere ausgesondert, durchschnittliche Tumorgroße kann nicht angegeben werden
n.v.	nicht verfügbar, Assay wurde durchgeführt, Daten jedoch nicht verfügbar
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
OD <sub>260</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm
ODN	Oligodesoxynukleotide
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
Pen./ Strep.	Penicillin/ Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pmol	Piko-Mol
PSA	prostata-spezifisches Antigen
Rest.	Restimulierung
pRB	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roosevelt Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasen-Ketten-Reaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang-DNA („single strand“)
Tab	Tabelle
TAP	transporter associated with antigen processing
TE	Tris-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borate-EDTA
T <sub>H</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrose-Faktor
t-RNA	Transfer-Ribonukleinsäure
Tween	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurat
U	internationale Enzymeinheiten der Aktivität (units)
ü.N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtskultur
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VLP	Virus-ähnliche Partikel (virus-like-particles)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## **1. Zusammenfassung**

Jedes Jahr werden weltweit etwa 493.000 neue Fälle von Zervixkarzinomen diagnostiziert (Parkin et al. 2005). Selbst bei optimaler Behandlung mit konventionellen Therapieformen (Chirurgie, Radio- und Chemotherapie) versterben etwa 40% dieser Patientinnen. Die „High-Risk“ Humanen Papillomaviren vom Typ 16 und 18 sind kausal mit dem Auftreten von 50 - 70% aller Zervixkarzinome assoziiert. Eine gegen diese HPV-Typen gerichtete multivalente therapeutische DNA-Vakzine könnte somit eine interessante Ergänzung der konventionellen Therapie darstellen.

Da die viralen Onkoproteine E6 und E7 konstitutiv und spezifisch in HPV-infizierten Tumorzellen exprimiert werden, stellen sie ein vielversprechendes Zielmolekül bei der Induktion einer HPV-spezifischen zellulären Immunantwort dar. Es wurde eine therapeutisch wirksame HPV16-E7-DNA-Vakzine entwickelt, in der das Wildtyp-E7-Gen rearrangiert („geschuffelt“) wurde (E7SH-Gen). Dieses artifizielle E7SH-Gen induziert im murinen Modell E7-Wildtyp-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten, T-Helfer-Zellen sowie Antikörper, bei einem gleichzeitigen Verlust der transformierenden Eigenschaften (Osen et al 2001, Dissertation Öhlschläger 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte im murinen Modell die Immunogenität der HPV16-E7SH-DNA-Vakzine durch die Ko-Applikation verschiedener Adjuvantien verbessert werden. Als adjuvante Gene wurden hierfür GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 ausgewählt. Zur Quantifizierung einer HPV16-E7-spezifischen zellulären Immunantwort für *in vitro* Restimulierungen von Milzzellen wurden Elispot- und <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Assays durchgeführt. Mittels muriner Tumor-Regressions-Experimente wurden die adjuvanten Effekte *in vivo* dokumentiert.

Alle bisherigen E7SH-Immunisierungen erfolgten mit dem Vektor pTHamp. Da dieser Vektor aufgrund seines Ampizillin-Resistenzgens nicht für Immunisierungen am Menschen zugelassen ist, wurde die HPV16-E7SH-DNA in verschiedene CpG-Vektor-Systeme (CpG16 und CpG50) integriert. Diese CpG-Vektoren sind bereits in unterschiedlichen klinischen Studien am Menschen mit bisher milden Nebenwirkungen und einer starken immunstimulierenden Wirkung getestet worden. In dieser Arbeit wurde die Immunantwortsteigernde Wirkung dieser CpG-Vektoren im Vergleich zum pTHamp-Vektor mittels Elispot-Assay, <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Assays und in murinen Tumor-Regressions-Experimenten untersucht.

Bei der Ko-Applikation der drei adjuvanten Gene GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 wurde in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays in zwei von drei unabhängigen Experimenten für das IL-2-Gen eine

Steigerung der E7-spezifischen zellulären Immunantwort im Vergleich zum E7SH alleine festgestellt. Mittels  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay konnte jedoch für keines der adjuvanten Gene eine spezifische Lyse nachgewiesen werden. In den Tumor-Regressions-Experimenten wurde gezeigt, dass die Ko-Applikation des Adjuvants IL-2 ein hoch signifikant geringeres Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollgruppe pTHamp bewirkt. Während die Immunisierungen mit dem E7SH-Gen lediglich eine signifikante Tumor-Regression hervorriefen. Durch die adjuvanten Gene GM-CSF und IFN- $\gamma$  konnte keine Steigerung der Immunantwort erzielt werden.

Beim Vergleich der Immunisierungsvektoren pTHamp-E7SH, CpG16-E7SH und CpG50-E7SH konnte im Elispot-Assay die stärkste Induktion der E7-spezifischen zellulären Immunantwort durch den CpG16-Vektor erzielt werden. In den Tumor-Regressions-Experimenten stellte sich bei den mit den Konstrukten pTHamp-E7SH- und CpG16-E7SH-immunisierten Tieren ein verlangsamtes Tumorstadium im Vergleich zu den Kontrollgruppen dar. Der CpG50-Vektor zeigte sowohl in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays als auch in den Tumor-Regressions-Experimenten keine Steigerung, sondern sogar eine Verringerung der Immunantwort.

Insgesamt kann man aus den Ergebnissen dieser Arbeit schlussfolgern, dass von den potentiellen Adjuvantien vor allem das adjuvante Gen IL-2 und von den Vektor-Systemen der Immunisierungsvektor CpG16 zu einer Steigerung der Immunantwort der HPV16-E7SH-DNA geführt haben. In weiterführenden Studien sollten weitere mögliche adjuvante Gene und vor allem die Kombination verschiedener Adjuvantien untersucht werden. Es könnte z.B. das adjuvante Gen IL-2 zusammen mit dem CpG16-E7SH-Vektor ko-appliziert werden, um den in dieser Arbeit dargestellten adjuvanten Effekt beider Konstrukte zu addieren.

Der Einsatz der in dieser Arbeit untersuchten Adjuvantien könnte in Zukunft auch bei anderen DNA-Vakzinen gegen Viren-assoziierte Erkrankungen zur Anwendung kommen. Aufgrund ihrer Stabilität, ihrer leichten Modifizierbarkeit und ihrer billigen und einfachen Synthetisierung wären diese DNA-Impfstoffe speziell für Immunisierungen in Dritte Welt Ländern eine sehr gute Alternative.

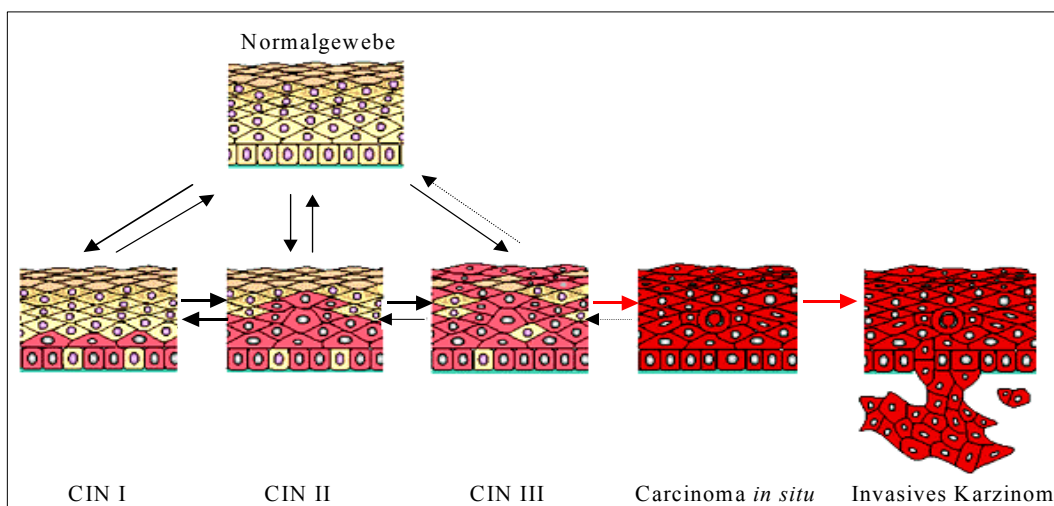
## 2. Einleitung

### 2.1 Das Zervixkarzinom

Der Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) ist die siebthäufigste aller Tumorerkrankungen weltweit und nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Krebsart der Frauen (Parkin et al. 2005). Jährlich erkranken weltweit etwa 493.000 Frauen an einem Zervixkarzinom. Insgesamt treten 83% dieser Krebserkrankungen in den Ländern der Dritten Welt auf. In den Industrienationen ist seit der Einführung von Vorsorge-Programmen in den 60er Jahren die Inzidenz von anfänglich 38 pro 100.000 Frauen auf 14,5 pro 100.000 Frauen gesunken (Parkin et al. 2005). In Deutschland wird die Zahl der Neuerkrankungen auf 6.200 bis 7.100 pro Jahr geschätzt (Schneider et al. 2001). Das entspricht in etwa 16,5 pro 100.000 Frauen. Im Vergleich zu anderen europäischen Ländern (Beispiel: Spanien 5 pro 100.000 Frauen) liegt die Inzidenz damit relativ hoch. Weltweit sterben pro Jahr etwa 274.000 Frauen am Zervixkarzinom (Parkin et al. 2005). Eine HPV-Beteiligung an der Entstehung des Gebärmutterhalskrebses wurde erstmals im Jahre 1976 postuliert (zur Hausen 1976). Als Risikofaktor für die Entwicklung eines Zervixkarzinomes gilt eine Infektion mit „High-Risk“ humanpathogenen Papillomaviren (HR-HPV). Weitere Risikofaktoren stellen das Rauchen, das Alter, die Zahl der Sexualpartner, eine gleichzeitige Infektion mit Viren (Herpes genitalis, HIV), die Schwächung des Immunsystems sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva dar (Franco et al. 2003). Histologisch unterscheidet man zwischen Plattenepithelkarzinomen (77% der invasiven Karzinome) und Adenokarzinomen (11% der invasiven Karzinome) sowie adenosquamösen und unspezifischen Formen (Schneider et al. 2001).

Das Zervixkarzinom entwickelt sich über verschiedene Schweregrade prämaligener Läsionen (Dysplasien) aus normalen Epithelzellen der Ekto- und/ oder Endozervix. In der histologischen Klassifikation der WHO werden diese Läsionen als zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) bezeichnet und in drei verschiedene Stadien (CIN I-III) sowie das Karzinom *in situ* eingeteilt (Richart et. al. 1990 und 1973). Das gemeinsame Merkmal aller histologischen Stadien sind Störungen der Epithelausreifung. Die Kriterien zur Unterscheidung der Schweregrade sind Läsionsgröße und histologisches Bild, wonach die Einteilung in CIN I (leichte), CIN II (mittelschwere), CIN III (schwere Epitheldysplasie) und Carcinoma *in situ* (CIS) durchgeführt wird (siehe Abb. 2/1). CIN I stellt ein dem normalen Epithel ähnliches Differenzierungsbild mit nur wenigen mitotisch aktiven Zellen oberhalb der Basalmembran dar. Es kann außerdem sehr häufig eine Regression beobachtet werden (Syrjanen et al. 1987). Die mittelschweren CIN II-Läsionen weisen eine höhere Anzahl an mitotisch aktiven Zellen und eine in den meisten Fällen fehlende Differenzierung auf. Bei den

schweren Dysplasien (CIN III) und dem Carcinoma *in situ* ist keine Differenzierung des Epithels mehr zu erkennen. Zusätzlich treten atypische Mitose-Figuren und eine verschobene Kern-Plasma-Relation auf (Lechner et al. 1992, Doorbar et al. 1997). Histologisch abgrenzen lässt sich das Zervixkarzinom von CIN III-Läsionen anhand des Durchbruches der Dysplasien durch die Basalmembran (siehe Abb. 2/1).



**Abb. 2/1: Zervixkarziogenese** (modifiziert nach [www.gesundheit.de](http://www.gesundheit.de)) CIN-Läsionen (prämaligene Vorstufen) des Zervixkarzinomes können sich im Laufe von Monaten bis Jahren spontan zurückbilden (↔), persistieren (→) bzw. zu höhergradigen Läsionen (→) oder zum Karzinom progredieren (→). Mit zunehmendem Schweregrad nimmt die Fähigkeit zur Regression ab (-->). (Ostor et al. 1993).

Nach diesem Durchbruch der Basalmembran, die das Epithel von dem mit Gefäßen durchzogenen Stroma abgrenzt, beginnt die Invasion in das umliegende Gewebe. Bedingt durch die gute lymphatische Versorgung des Gebärmutterhalses kommt es oft sehr frühzeitig zu Metastasierungen. Die neoplastischen Vorstufen sind allerdings keine zwingende Bedingung für die Entstehung eines Zervixkarzinomes (Koutsky et al. 1992). In verschiedenen Studien der letzten Jahre wurde gezeigt, dass alle CIN-Arten spontan regredieren, unverändert persistieren oder zu invasiven Tumoren progredieren können. Ostor et al. (1993) zeigten in einer Zusammenfassung ausgewählter Studien, dass 57% der CIN I-, 43% der CIN II- und 32% der CIN III-Läsionen regredieren. Persistierende prämaligene Vorstufen wurden bei 32% der CIN I-, 35% der CIN II- und weniger als 56% der CIN III-Läsionen beobachtet. Zu invasiven Zervixkarzinomen progrediert nur ein kleiner Teil der Dysplasien (1% CIN I, 5% CIN II, >12% CIN III). Nach morphologischen Gesichtspunkten lässt sich also keine Voraussage treffen, welche Neoplasie regrediert oder progrediert (Ostor et al. 1993). Molekularbiologische und epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Infektionen mit HR-HPV mit der Zervixkarziogenese korrelieren (Schiffmann et al. 1993, Bosch et al. 1995, Kjaer et al. 1996). Nach Isolierung von HR-HPV Genomen aus Zervixkarzinomen (Dürst et al. 1983, Boshart et al. 1984) konnte gezeigt werden, dass in

99,7% aller Karzinome DNA eines HR-HPV-Typen gefunden wurde (Walboomers et al. 1999). Im Vergleich zur großen Verbreitung von HPV-Infektionen liegt die Rate an Zervixkarzinomen insgesamt sehr niedrig. Nur 2% der infizierten Frauen entwickeln ein Zervixkarzinom. (zur Hausen et al. 1991). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine HPV-Infektion eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für ein Karzinom ist. Eine persistierende HPV-Infektion wird als hauptsächliche Ursache für die Entstehung von Zervixkarzinomen angesehen. Es sind aber ebenso zusätzliche genetische und/ oder epigenetische Ereignisse für die Karziogenese der Zervix von Bedeutung (Larson et al. 1997).

## **2.2 Humane Papillomaviren**

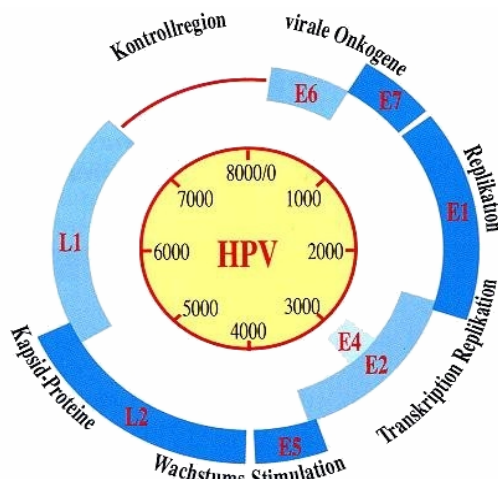
Die Papillomaviren wurden noch vor einigen Jahren zusammen mit den Polyomaviren zur Familie der Papovaviridae gezählt. Heute werden sie als eigenständige Familie zu den Papillomaviridae zusammengefasst (van Regenmortel et al. 2001, de Villiers et al. 2004) und in über 140 verschiedene Typen klassifiziert. Sie sind vor allem in höheren Vertebraten weit verbreitet und weisen eine hohe Speziespezifität auf. Die Erstbeschreibung eines Papillomavirus erfolgte vor 70 Jahren im Kaninchen (cottontail rabbit papillomavirus, Shope und Hurst 1933). Bis heute wurde neben vielen weiteren auch eine Vielzahl an humanen Papillomaviren (HPV) identifiziert. Aufgrund der strengen Wirtsspezifität erfolgt die Benennung nach der Wirtsspezies und einer fortlaufenden Nummerierung. Eine Klassifizierung der HPV-Typen erfolgt aufgrund des infizierten Gewebes nach kutaner oder mukokutaner Lokalisation entsprechend ihres Tropismus. Kutane Läsionen befallen die verhornende Haut und präsentieren sich als massive Hyperkeratosen. Es handelt sich meist um vulgäre Warzen, die vor allem durch die HPV-Typen 1, 2, 3, 4, 7, 10, 26-29, 41, 48, 60, 63 und 65 verursacht werden. Lokalisiert sind diese Warzen zumeist an Armen und Beinen. Die mukokutanen HPV-Typen treten oral oder anogenital auf. Aufgrund des onkogenen Potentials kann eine Differenzierung in „High-Risk“- und „Low-Risk“-HPV-Typen (LR-HPV) vorgenommen werden. Zur Gruppe der HR-HPV werden HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 und 73 gezählt (Munoz et al. 2004). Die HPV-Typen 16, 18, 31 und 45 können dabei in 80% der Zervixkarzinome detektiert werden (Munoz et al. 1996). Die mukosalen „Low-Risk“-HPV-Typen 6 und 11 sind für die Ausbildung der Feigwarzen (Condyloma acuminata) im anogenitalen Bereich verantwortlich (Cheah et al. 1998). Die Übertragung der mit dem Auftreten der vulgären Warzen assoziierten HPV-Typen erfolgt vorwiegend durch direkten Hautkontakt oder in öffentlichen Schwimmbädern und Saunen. Für die hauptsächlich sexuell übertragenen anogenitalen HPV-Typen sind die

Hauptrisikofaktoren sexuelle Erfahrungen im sehr jugendlichen Alter sowie häufig wechselnde Sexualpartner. Da für eine HPV-Typisierung keine spezifischen Antikörper existieren, werden die HPV-Gruppen nicht serotypisch, sondern nach dem Genotyp bestimmt. Die genetische Klassifizierung erfolgt u.a. durch Sequenzanalysen des Hauptkapsid-Proteins L1 (de Villiers et al. 1997). Ein Sequenzunterschied von mehr als 10% im L1-Gen gegenüber allen bereits bekannten Typen dient als Kriterium für einen neuen HPV-Typ (Deliuss et al. 1998). Bei einem L1-Sequenzunterschied zwischen 2% und 10% handelt es sich um einen Subtyp. Bei weniger als 2% liegt eine intratypische Variante vor (Deliuss et al. 1994, de Villiers et al. 1994, Myers et al. 1996). Für die Vergabe der Bezeichnung für vollständig klonierte und sequenzierte HPV-Genome ist das Referenzzentrum für humanpathogene Papillomaviren, das Deutsche Krebsforschungsinstitut in Heidelberg (DKFZ), verantwortlich.

### **2.3. Das Genom der Humanen Papillomaviren**

Papillomaviren sind nicht membranumhüllte, 55nm große und in ein ikosaedrisches Kapsid verpackte DNA-Viren. Das Kapsid besteht aus 72 Kapsomeren, welche sich zu 80% aus dem Haupt-Strukturprotein L1 und zu 20% aus dem Strukturprotein L2 zusammensetzen. Das zirkuläre und doppelsträngige Genom der Viren, mit einer Größe von etwa 8.000 Basenpaaren, befindet sich, an vier zelluläre Histone gebunden, im Inneren des Kapsids. Von den beiden DNA-Strängen ist nur einer für Proteine kodierend. Das zirkuläre virale Genom wird in drei Abschnitte unterschiedlicher Länge und Funktion unterteilt (siehe Abb. 2/2). Die Genprodukte der frühen Region (early, E) werden in der frühen Phase der Virenreplikation exprimiert und besitzen vor allem regulatorische Funktionen. Eine späte Genregion kodiert für die spät (late, L) exprimierten Strukturproteine L1 und L2. Die Transkription dieser beiden Bereiche verläuft unter Verwendung der verschiedenen offenen Leserahmen eines DNA-Stranges. An vielen Orten des Genoms sind Spleißdonor- und Akzeptorstellen zu finden, die zur Synthese der verschiedenen Produkte verwendet werden. Der dritte Abschnitt des Genoms befindet sich zwischen dem Ende der späten und dem Beginn der frühen Region. Hier liegt ein circa 1.000 Basenpaare langer Bereich, welcher nicht für virale Proteine codiert. Dieser als „Long Control Region“ (LCR) bezeichnete Bereich enthält die meisten viralen cis-wirksamen Kontrollelemente wie Promotoren und Enhancer sowie den Replikationsursprung (Sibbet und Campo 1990). Die Expression der verschiedenen HPV-Gene ist abhängig vom Differenzierungsgrad der infizierten Epithel-Zelle. HPV-Partikel dringen über kleinste Verletzungen in die Haut- bzw. Schleimhautschicht ein und gelangen bis ins *Stratum basale*, wo sie die undifferenzierten Zellen infizieren. Die Partikel binden dabei wahrscheinlich an

den  $\alpha 6$ -Integrinrezeptor (Evander et al. 1997, Müller et al. 1995) und werden durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert (Müller et al. 1995, Volpers et al. 1995). Das virale Genom gelangt in den Kern der Zelle, wo es in episomaler Form mit einer Kopien-Anzahl von 50 - 100 pro Zelle vorliegt (Dürst et al. 1985). Bereits hier beginnt die Expression der frühen viralen Gene E6 und E7. Es kommt zur Stimulierung der Zellteilung.



**Abb. 2/2: Grafische Darstellung der HPV-Genomstruktur** mit den offenen Leserahmen (E1 - E7, L1 und L2) und der Kontrollregion (LCR). Die Transkription erfolgt im Uhrzeigersinn. Zum Teil überlappen sich die offenen Leserahmen (entnommen aus: <http://www.cervical-cancer.de/hpvpartikel/target.html>).

Bei dieser Teilung einer HPV-infizierten Stammzelle wird das duplizierte humane und virale Genom auf beide Tochterzellen aufgeteilt. Eine der beiden Tochterzellen bleibt als Stammzelle im *Stratum basale*, die andere wandert ins *Stratum spinosum*. In dieser Zellschicht beginnt die Differenzierung der HPV-positiven Keratinozyten und es kommt zur Wechselwirkung zwischen zellulären Faktoren und den späten viralen Promotoren. Zudem erfolgt hier die Expression der späten viralen Proteine sowie die Amplifikation des viralen Genoms. Im *Stratum granulosum* kommt es zur weiteren Differenzierung und zur Interaktion der L1- und L2-Proteine und somit zur Synthese der viralen Kapside (Stubenrauch et al. 1999). In der obersten Hautschicht, dem *Stratum corneum*, werden durch Abschilferung der ausdifferenzierten Keratinozyten die HPV-Partikel freigesetzt (Roden et al. 1994).

## 2.4 Die frühen Proteine der Papillomaviren (E1 - E7)

Der Leserahmen **E1** codiert für phosphorylierte Proteine, welche für die Replikation des viralen Genoms erforderlich sind (Chiang et al. 1992, Del Vecchio et al. 1992). Die E1-Proteine besitzen ATPase- und Helikaseaktivität (Lambert et al. 1991, Wilson et al. 2002) und binden an eine AT-reiche Sequenz im Replikationsursprung der LCR (Ustav et al. 1991, Frattini et al. 1994). Es werden die beiden Proteinfunktionen **E1-M** (modulierende Funktion) und **E1-R** (aktiv bei der Replikation) unterschieden. Das E1-M-Protein kontrolliert in undifferenzierten Epithelzellen die Genomreplikation (50 - 400 Kopien pro infizierte Zelle).



Im Gegensatz dazu wird das E1-R-Protein in ausdifferenzierten Epidermiszellen aktiv und bewirkt ein Umschalten der konstanten Genomreplikation zur produktiven Virusvermehrung. Innerhalb des E2-Leserahmens werden die Proteine **E2** und **E2-Tr** codiert.

Das **E2-Protein** besteht aus zwei funktionellen Domänen, einer C-terminalen und einer N-terminalen transaktivierenden Domäne. Durch Bindung an Promotoren der viralen LCR besitzt es transaktivierende Funktionen und bewirkt eine Stabilisierung der E1-DNA-Bindung (Mohr et al. 1990, Sedmann et al. 1997). Über die Bindung an die Tata-Box kommt es zu einer negativen Regulation der E6/ E7-Expression, da die Bindung des RNA-Polymerasenkomplexes an den Promotor aus sterischen Gründen verhindert wird (Cripe et al. 1987, Romanczuk et al. 1990). Das **E2-Tr-Protein** wirkt als funktioneller Gegenspieler des E2 (Transrepressor). Die Konzentration und das Mengenverhältnis beider Proteine zueinander stellen die entscheidenden Faktoren für die Transaktivierung oder Transrepression dar. In HPV-assoziiertem malignem Gewebe kommt es, zumeist innerhalb des E2-Leserahmens, zu einer Integration des HPV-Genoms, in deren Folge die Repression der beiden transformierenden Proteine E6 und E7 aufgehoben wird (Dürst et al. 1985, Cullen et al. 1991, Wells et al. 2003).

Die Funktion des **E3-Leserahmens** ist bisher unbekannt. In den meisten humanen Papillomavirustypen existiert kein E3-Leserahmen.

Das **Protein E4** codiert im Bereich des frühen Leserahmens E4, wird aber erst spät im Infektionszyklus als E1<sup>E4</sup> Splicevariante exprimiert. Die Expression korreliert mit der viralen DNA-Replikation und fehlenden Differenzierungsmarkern (Doorbar et al. 1997). E4 destabilisiert die Keratinfilamente (Zytoplasma der Zelle), wodurch es zur Auflösung des Keratinnetzwerkes und zur erleichterten Freisetzung der Viren kommt (Doorbar et al. 1991, Roberts et al. 1993).

In verschiedenen Transformationsassays wurden die onkogenen Eigenschaften der viralen Proteine E5, E6 und E7 nachgewiesen (Stoppler et al. 1996, Zwerschke und Jansen-Dürr 2000). Diese Proteine stimulieren die Proliferation, indem sie mit zellulären Proteinen, die der Kontrolle des Zellzyklus dienen, interagieren.

Bei HPV interagiert das Transmembranprotein **E5** vor allem mit zellulären Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor) und dem PDGF-Rezeptor (platelet derived growth factor), woraufhin diese dauerhaft aktiviert werden (Rodriguez et al. 2000). Eine tragende Rolle für die maligne Transformation besitzen die viralen **Onkoproteine E6** und **E7** der HR-HPV-Typen. Als strukturbildendes Motiv beinhaltet das E6-Onkoprotein zwei Zinkfinger motive und das E7-Protein ein Zinkfinger motiv. Diese Motive sind für die zelluläre Stabilität und die biologische Funktion notwendig. Es wird

davon ausgegangen, dass es sich bei E6 und E7 um homologe Proteine handelt, welche durch Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläuferprotein hervorgegangen sind (Cole und Danos 1987).

Das **E6-Protein** der HR-HPV-Typen 16 und 18 tritt in Wechselwirkung mit der intrazellulären Protein-Ubiquitin-Ligase E6-AP (E6-assoziiertes Protein, Huibregtse et al. 1991). Es kommt zur Übertragung aktivierter Ubiquitin-Reste auf das Tumorsuppressorgen p53, welches daraufhin der vorzeitigen proteosomalen Degradation zugeführt wird (Hubbert et al. 1992, Scheffner et al. 1993). Normalerweise dient p53 der Zellzykluskontrolle, indem es die Expression von Proteinen, wie dem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor p21, reguliert. Bei einer Zellschädigung wird vermehrt p53 gebildet, welches die Bildung des p21 initiiert und daraufhin den Zellzyklus in der G1- und G2-Phase arretiert. Im Falle umfangreicher DNA-Schädigungen kommt es direkt zum programmierten Zelltod (Apoptose) durch Transkriptionsaktivierung der Bax- und Transkriptionsreprimierung der Bcl-Gene (Longworth und Laimins et al. 2004). Im Gegensatz zu den HR-HPV-Typen wird bei den LR-HPV-Typen 6 und 11 keine p53 Degradation induziert (Gage et al. 1990, Halbert et al. 1992). Hier wird bei unregulierter DNA-Synthese in HPV-unauffälligen Zellen die Ubiquitin-Ligase Mdm2, welche die p53-Degradation vermittelt, inhibiert. Es folgt eine p53-Akkumulation und daraufhin eine Aktivierung p53-abhängiger Promotoren. Diese führen zu einem Zellzyklusstopp und zur DNA-Reparatur. In HR-HPV-positiven Zellen ist dieser Mdm2-Weg vollständig gehemmt und folglich nur die E6-abhängige p53-Degradation aktiv (Hengstermann et al. 2001). Es werden die Einleitung der Apoptose bzw. ein p53-abhängiger Zellzyklusstopp verhindert und die Entstehung von Mutationen erleichtert. Unabhängig von p53 aktiviert E6 zusätzlich die zelluläre Telomerase (Klingelhutz et al. 1996), die während der Replikation die Telomere vervollständigt und somit bedeutend zur Immortalisierung der Zellen beiträgt.

Neben dem E6-Protein ist zur effizienten Immortalisierung von Epithelzellen auch das **E7-Protein** essentiell (Münger et al. 1989). Im Verlauf einer HPV-Infektion ist das E7-Protein der HR-HPV-Typen hauptverantwortlich für die verstärkte Zellproliferation. E7 ist ein 98 Aminosäuren langes Protein, das die drei konservierten Sequenzabschnitte CR 1 - 3 (conserved region) beinhaltet. Die in der Mitte gelegene CR 2-Region ist in der Lage, eine Bindung zu verschiedenen Mitgliedern der „Pocket-Protein-Familie“ (z.B. Retinoblastom-Protein (pRB), p130, p107) einzugehen. Das E7-Protein der LR-HPV besitzt eine nur geringe Affinität zum pRB (Gage et al. 1990) und verursacht keine pRB-Degradation (Gonzales et al. 2001). In nichtinfizierten Zellen liegt das pRB während der Mitose in phosphorylierter, inaktiver Form vor. Beim Übergang in die G1-Phase des Zellzyklus wird es dephosphoryliert

und damit aktiviert. Es bindet sich in dieser Form an die Transkriptionsfaktoren E2F, womit diese inaktiviert werden. Durch diese Verbindung wird die Aktivierung von S-Phase-Proteinen, wie z.B. Zyklin E, Thymidinkinase oder DNA-Polymerase, welche für das Fortschreiten des Zellzyklus benötigt werden, verhindert. (Beijersbergen et al. 1996). Treten die Zellen in die S-Phase ein, erfolgt über Zyclin-abhängige Kinasen (CDK, cyclin dependant kinase) die Phosphorylierung und somit Inaktivierung der pRB-Proteine, wodurch es zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F und zur Fortsetzung des Zellzyklus kommt. In infizierten Zellen interagiert während der G1-Phase das E7-Protein mit dem pRB-Protein, welches in dieser Phase als pRB/E2F-Komplex vorliegt. Es kommt zu einer Konformationsänderung des E7-pRB/E2F-Komplexes und daraufhin zu einer Freisetzung der E2F-Proteine. Diese aktivieren die entsprechenden Promotoren und es kommt zum verfrühten Eintritt der Zelle in die S-Phase. Die gekoppelte Regulierung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie die Abhängigkeit der Zellteilung von mitogenen Signalen werden verhindert. Während der normalen Zellentwicklung kommt es bei einer Zunahme der Differenzierung zu einer Reduzierung bzw. Beendigung der Proliferationsaktivität und einem Zellzyklus-Arrest in der G0-Phase.

Ein weiterer Angriffspunkt des E7-Proteins ist die Inaktivierung der Zyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren  $p21^{CIP1}/p27^{KIP1}$ , wodurch der Arrest von Zellen in der G1-Phase verhindert wird (Funk et al. 1997, Jones et al. 1997). Außerdem führt E7 zu einer Resistenz gegenüber antimitogenen Signalen. Aufgrund der p53- und pRB-Degradation durch die onkogenen Proteine E6 und E7 kommt es an entscheidenden Kontrollpunkten zum Verlust der Zellzykluskontrolle. Dies führt letztlich zu einer Akkumulation von Mutationen, welche als Voraussetzung für die Immortalisierung gelten (Hoppe-Seyler und Butz et al. 1994).

Die Relevanz der E6- und E7-Genprodukte in der Karzinogenese wird durch den konsistenten Nachweis in Zervixkarzinomen bestätigt (zur Hausen et al. 2000). Jedoch ist eine Überexpression dieser Onkogene nur zur Immortalisierung von Epithelzellen ausreichend. Um eine Transformation zu bewirken, bedarf es weiterer Faktoren. Dürst et al. (1995) zeigten, dass HPV16-immortalisierte Keratinozyten nur nach Bestrahlung, nach längerer Passage oder bei Ko-Transfektion des aktiven ras-Onkogens tumorigene Eigenschaften aufweisen.

## **2.5 Die späten Proteine der Papillomaviren**

Die beiden späten Gene L1 und L2 der humanen Papillomaviren werden ausschließlich in ausdifferenzierten Keratinozyten exprimiert. Sie codieren für die Strukturproteine L1 und L2. Das Hauptkapsid-Protein **L1** ist eines der stärksten Antigene der Papillomavirusproteine. Vor

allem nach Immunisierungen mit HPV-Kapsiden, aber auch nach einer natürlichen Infektion werden hohe Titer von Antikörpern gemessen (Stanley 2003, Berg et al. 2005). Ein pentameres Kapsomer wird aus fünf L1-Proteinen gebildet. Zweiundsiebzig dieser Kapsomere assemblieren zu einem Kapsid. Untereinander werden die Kapsomere über Disulfidbrücken (Sapp et al. 1998 und 1995) und Kalzium-Kationen (Li et al. 1998, Paintsil et al. 1998) stabilisiert. Das L1-Protein ist schwach phosphoryliert und besitzt keine DNA-bindenden Eigenschaften (Kirnbauer et al. 1993). Es ist ein stark konserviertes Protein, welches in der Lage ist, sich selbständig zu virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) zu verbinden (Christensen et al. 1994). Das zweite Strukturprotein **L2** ist nicht in der Lage, sich zu VLPs zusammenzulagern (Wang et al. 2003). Es besitzt Bedeutung bei der DNA-Bindung sowie der Internalisierung des Kapsids während der Wirtszellinfektion (Kawana et al. 2001).

## **2.6 Die Immunantwort nach einer HPV-Infektion**

Für die Kontrolle und Elimination von HPV-Infektionen spielt vor allem die MHC I- und MHC II-abhängige zelluläre Immunantwort eine entscheidende Rolle (Nakawaga et al. 1999). Eine Immundefizienz korreliert mit einer gesteigerten Inzidenz für persistierende HPV-Infektionen. Für AIDS-Patienten (Maiman et al. 1990) sowie für immunsupprimierte Nieren-Transplantations-Patienten (Shamanin et al. 1994) wurde gezeigt, dass ein gesteigertes Risiko für genitale HPV-Infektionen und HPV-bedingte maligne Erkrankungen besteht. Außerdem konnten infiltrierende  $CD4^{+}$ - und  $CD8^{+}$ T-Zellen in spontan regredierenden, HPV-assoziierten Warzen nachgewiesen werden (Coleman et al. 1994, Knowles et al. 1996). Das Immunsystem setzt sich aus dem angeborenen und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem zusammen. Das angeborene, unspezifische Abwehrsystem (physikalische/ chemische Barrieren, Komplementsystem, unspezifische Phagozyten) bildet eine erste Verteidigungslinie. Es hat die Aufgabe, die Pathogene bis zur Induktion des adaptiven Immunsystems unter Kontrolle zu halten. Die antigenspezifischen Lymphozyten des adaptiven Immunsystems lassen sich in zwei Hauptgruppen, die B- und T- Lymphozyten, unterteilen. Die Aufgabe der B-Lymphozyten ist die Bildung spezifischer Antikörper (humorale Immunantwort). T-Lymphozyten bekämpfen durch Bakterien, Viren und Parasiten verursachte intrazelluläre Infektionen. Diese Zellen stellen einen Teil der zellulären Immunantwort dar. Im Verlauf einer Virusinfektion werden die viralen Proteine im Zytosol durch die infizierte Zelle selbst synthetisiert und durch das Proteasom (multikatalytischer Proteasekomplex) zu Peptidfragmenten degradiert. Das Proteasom ist ein zylindrischer Komplex bestehend aus 28 Untereinheiten. Als Reaktion auf eine Virusinfektion werden drei neue Untereinheiten

(LMP2, LMP7, MECL1) gebildet. Diese ersetzen drei konstitutiv exprimierte Untereinheiten und es entsteht ein Immunproteasom (Tanaka und Kasahara 1998). Durch diesen Austausch verändert sich die Spezifität des Proteasoms und das Spektrum der produzierten Peptide variiert (Cardozo und Kohanski et al. 1998). Anschließend erfolgt mit Hilfe heterodimerer, ATP-bindender TAP-Moleküle (transporters associated with antigen processing) der Transport der Peptidfragmente aus dem Zytoplasma ins Endoplasmatische Retikulum (ER). Die Peptide binden im Lumen des ER an MHC-I Moleküle („major histocompatibility complex“). Im Menschen werden die MHC-Moleküle als HLA („human leucocyte antigens“) bezeichnet. Der Komplex aus Peptid und MHC-I Molekül wird mittels Golgi-Apparat bis an die Zelloberfläche befördert. Hier kann er von spezifischen CD8+T-Zellen über deren T-Zellrezeptor erkannt werden und stellt, im Fall von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, eines der notwendigen Signale zur Aktivierung der naiven T-Zelle dar.

Zur Aktivierung der T-Zellen werden noch weitere ko-stimulatorische Signale benötigt. Zu diesen gehören das CD80 (B7.1) und das CD86 (B7.2), die an der Oberfläche von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (DCs, B-Zellen, Makrophagen) exprimiert werden (Carreno et al. 2002, Slavik et al. 1999). Diese ko-stimulatorischen Signale interagieren mit den entsprechenden Liganden (CD28) auf den T-Zellen. Hierdurch kommt es zur Aktivierung dieser. Falls nichtprofessionelle Antigen-präsentierende Zellen (z.B. Keratinozyten) via MHC-Komplex HPV-Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren, geschieht dies meist oberhalb der Basallamina. Da hier nur sehr wenige professionelle APCs vorhanden sind, fehlen die für die Aktivierung der T-Zellen notwendigen ko-stimulatorischen Moleküle der APCs. Die T-Zellen werden daraufhin anerg und können selbst durch einen folgenden Kontakt mit APCs nicht mehr aktiviert werden. Sie werden unweigerlich der Apoptose zugeführt. Innerhalb der zellulären Immunantwort scheint die MHC-II-restringierte T-Helferantwort eine bedeutende Rolle bei der HPV-Infektion zu spielen. Das herausragende Merkmal der MHC-Gene ist ihr ausgeprägter Polymorphismus. Wenn z.B. ein Peptid an eine bestimmte allelische Variante eines MHC-Moleküls gebunden ist, so wird es von der T-Zelle wahrgenommen. Ist das gleiche Peptid jedoch nicht mit dem MHC-Molekül assoziiert, wird es von der T-Zelle nicht erkannt. Aufgrund dieses Verhaltens, das man als MHC-Restriktion bezeichnet, unterscheiden sich Individuen mit verschiedenen HLA-Haplotypen in ihrer Fähigkeit, auf das gleiche Antigen mit einer zellvermittelten Immunantwort zu reagieren. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie präsentieren Peptide aus Proteinen, welche im Zytoplasma der Zelle abgebaut werden (z.B. zelleigene Proteine, virale Proteine). Das Immunsystem überwacht den Körper fortwährend auf das Vorhandensein viraler und bakterieller Infektionen sowie entarteter Zellen, indem es überprüft, ob die Zellen

körpereigene oder körperfremde Proteine präsentieren. Die CD8<sup>+</sup>T-Zellen sind so selektioniert, dass sie in der Regel nur Zellen attackieren, die ein körperfremdes Proteinbruchstück präsentieren. Dieses Phänomen nennt man Selbsttoleranz. Es schützt den Körper vor Angriffen des eigenen Immunsystems. Bei Störungen und Fehlern können sich Autoimmunreaktionen entwickeln.

Im Gegensatz zu den MHC-I-Molekülen werden die MHC-II-Moleküle exklusiv von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (pAPCs, z.B. Makrophagen, aktivierten B-Zellen, Dendritische Zellen) exprimiert. Die pAPCs nehmen die exogenen Proteinantigene über Endozytose bzw. Phagozytose aus dem extrazellulären Milieu auf. Im sauren pH-Bereich der Endosomen werden diese Antigene durch Proteasen (Cathepsin B und D) verdaut. Anschließend fusionieren diese Endosomen mit zellulären Vesikeln, die MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Die MHC-II-Moleküle werden mit dem Peptid beladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo die Peptide dann präsentiert werden. Die Prozessierungswege der MHC-I oder MHC-II-Immunantwort sind aber nicht absolut voneinander getrennt. Es können sowohl Peptide von exogenen Proteinen über MHC-I (Reimann et al. 1994; Ulmer et al. 1994), als auch Endogene über MHC-II präsentiert werden.

Die präsentierten Peptide werden von T-Lymphozyten erkannt. Es gibt zwei Hauptklassen der T-Lymphozyten, die CD8-Korezeptor-exprimierenden zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup>CTL) und die CD4-Korezeptor-exprimierenden T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>TH). Die CD8-CTLs interagieren mit peptidgebundenen MHC-I-Molekülen, wohingegen die CD4<sup>+</sup>T-Helfer-Zellen Antigene erkennen, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Die CTLs führen u.a. über die Sekretion von Proteinen (z.B. Perforine, Granzyme) zur Lyse der Antigen-präsentierenden Zelle. Die T-Helfer-Zellen sind in der Lage, die Immunreaktion in eine CTL-vermittelte (zelluläre) oder in eine Antikörper-vermittelte (humorale) Richtung zu lenken. Hierzu lassen sich die CD4<sup>+</sup>TH-Zellen in Abhängigkeit ihres sezernierten Zytokinprofils in zwei funktionelle Klassen unterteilen, die TH<sub>1</sub>- und TH<sub>2</sub>-Zellen. Die TH<sub>1</sub>-Zellen produzieren u.a. die proinflammatorischen Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Interleukin-2 (IL-2) und den Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Diese Zytokine führen zur Aktivierung, Proliferation und/ oder Differenzierung von CTLs, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die TH<sub>2</sub>-Zellen sezernieren u.a. die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 sowie den Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Diese sind in der Lage, B-Zellen und somit die Synthese von Antikörpern zu aktivieren und die zelluläre Immunantwort zu unterdrücken, wodurch es zu einer humoral-dominierten Immunantwort kommt. Auch Makrophagen und Dendritische Zellen begünstigen über die Bildung von IL-12 die Differenzierung zu TH<sub>1</sub>-Zellen (Hsieh et al. 1993). Ebenso konnte gezeigt werden, dass CD4-

T-Zellen für eine CD8-T-Zell-Infiltration in das Tumorgewebe notwendig sind (Marzo et al. 2000). In benignem HPV-infiziertem Gewebe wurden aktivierte Makrophagen sowie die Sekretion der Makrophagen-Zytokine MCP-1 (Kleine-Lowinski et al. 1999), TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  detektiert. Für das MCP-1 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es weitere Makrophagen an den Ort der Infektion lockt. Den Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  und  $\beta$  sowie dem Interferon- $\gamma$  wird eine hemmende Wirkung auf die Expression der beiden viralen Onkogene E6 und E7 zugeschrieben. Bei der natürlichen Immunantwort gegen Papillomaviren sind die infizierten Epithelzellen normalerweise durch eine intakte Basallamina von wichtigen Komponenten des Immunsystems separiert, denn die Langerhans'schen-Zellen (Dendritische Zellen der Haut) finden sich nur im *Stratum basale* (Townsend et al. 1997). Die Expression der beiden Kapsidproteine L1 und L2 findet jedoch in höherdifferenzierten Keratinozyten statt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Häufigkeit der Langerhans'schen-Zellen umgekehrt proportional zur Schwere der Erkrankung ist (Viac et al. 1990, Morelli et al. 1993, Lehtinen et al. 1993).

Eine weitere mögliche Ursache einer ineffizienten zytotoxischen T-Zellantwort könnte sein, dass Tumorzellen oft eine verminderte MHC-Expression zeigen. Die Präsentation der viralen Antigene ist somit eingeschränkt und die Tumorzellen werden nicht von spezifischen T-Zellen erkannt. Außerdem exprimieren epitheliale Tumorzellen keine ko-stimulatorischen Signale, welche zur T-Zell-Antwort notwendig wären. HPVs haben somit im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, das Immunsystem effizient zu umgehen und gegebenenfalls einen Status der Immuntoleranz herzustellen (Tindle und Frazer et al. 1994, O'Brien und Campo et al. 2002).

## **2.7 Ansätze für eine therapeutische und prophylaktische HPV-Vakzinierung**

Gegen zahlreiche Krankheitserreger existieren Lebendimpfstoffe (z.B. Masern, Mumps, Röteln, Varizellen) sowie Totimpfstoffe (z.B. Hepatitis A und B). Da allerdings bis heute kein System zur Verfügung steht, indem sich humane Papillomaviren in ausreichender Quantität herstellen lassen, sind diese erfolgreichen Immunisierungsstrategien nicht auf HPV-Vakzinierungen übertragbar. Eine erste erfolgversprechende prophylaktische Möglichkeit der Immunisierung stellte die Entwicklung sogenannter virus-like-particles (VLPs) dar. Hierbei handelt es sich um Virus-Kapside, die sich nach der Expression (in Hefezellen oder Insektenzellen) der Strukturproteine L1 und L2 spontan zu „leeren“ Viruspartikeln zusammenlagern (Kirnbauer et al. 1992), welche weder virale DNA noch onkogene Proteine

enthalten (Berry und Palefsky 2003). Bezüglich der Partikel-Struktur konnten im Kryoelektronenmikroskop keine Unterschiede zu nativen HPV-Partikeln nachgewiesen werden (Hagensee et al. 1994). Nach VLP-Injektion konnte eine starke Antikörper-Synthese (Breitburd et al. 1999) sowie eine spezifische CTL-Induktion gezeigt werden (Breitburd et al. 1995, Rudolf et al. 1999).

Für einen therapeutischen Einsatz sollten CTLs gegen die beiden kontinuierlich exprimierten Onkoproteine E6 und E7 induziert werden (Gissmann et al. 2001, Stern et al. 2001). Beide stellen potentielle Tumor-spezifische Antigene dar und induzieren eine spezifische zelluläre Immunantwort (Stern et al. 2001, Berry und Palefsky 2003). Im murinen Modell konnten nach Protein- bzw. Peptid-Immunisierung bereits E7-spezifische CTLs nachgewiesen werden (Ressing et al. 1995). Zur Erzielung eines therapeutischen Nutzens der VLPs, wurden sogenannte chimäre virus-like-particles (CVLPs) entwickelt. Nach Fusion des C-terminal trunkierten L1-Hauptkapsidproteins an die N-terminalen Sequenzen des HPV16-E7-Onkoproteins konnten bis zu einer E7-Länge von 60 Aminosäuren chimäre virusähnliche Partikel synthetisiert werden (Müller et al. 1997). Im murinen Modell waren CVLPs in der Lage, sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort zu induzieren (Müller et al. 1997, Schäfer et al. 1999). Da jedoch nur ein Teil des Onkogens appliziert wird, gehen potentielle CTL- oder T-Helferepitope verloren, so dass diese Vakzinierung aufgrund des MHC-Polymorphismus möglicherweise nicht für alle Teile einer Population gleich wirksam ist (Ressing et al. 1995, Schäfer et al. 1999). In einer ersten klinischen Studie der Firmen Medigene (München) und Schering (Berlin) konnte die klinische Wirksamkeit der CVLPs an Menschen nicht bestätigt werden ([www.medigene.de](http://www.medigene.de)). Eine mögliche Vakzinierungsalternative könnten die Kapsomere bilden. Diese Sub-Kapside können nach bakterieller Expression einfach aufgereinigt werden. Nach der Immunisierung mit Kapsomeren wird eine humorale Immunantwort induziert (Rose et al. 1998, Fligge et al. 2001, Yuan et al. 2001). Bei einer Fusion längerer E7-Sequenzen an das L1-Protein wird die CVLP-Formation unterbunden ohne die Kapsomer-Bildung zu beeinflussen (Müller et al. 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass HPV16-L1-Kapsomere zur Induktion von L1-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten führen (Öhlschläger et al. 2003).

Eine weitere vielversprechende, noch relativ junge Strategie zur Vakzinierung stellt die Applikation von nackter DNA dar. Gegenüber anderen Vakzinen (z.B. Proteinimpfstoffen) besitzen DNA-Impfstoffe folgende Vorteile: (1) Da die gereinigte DNA in entsprechenden Puffern sehr stabil ist, benötigt sie im Gegensatz zu proteinbasierenden Impfstoffen keine durchgehende Kühlungskette. (2) DNA-Vakzine können einfach und günstig synthetisiert werden und sind deshalb kostengünstig. Diese beiden Vorteile machen die DNA-Vakzine für

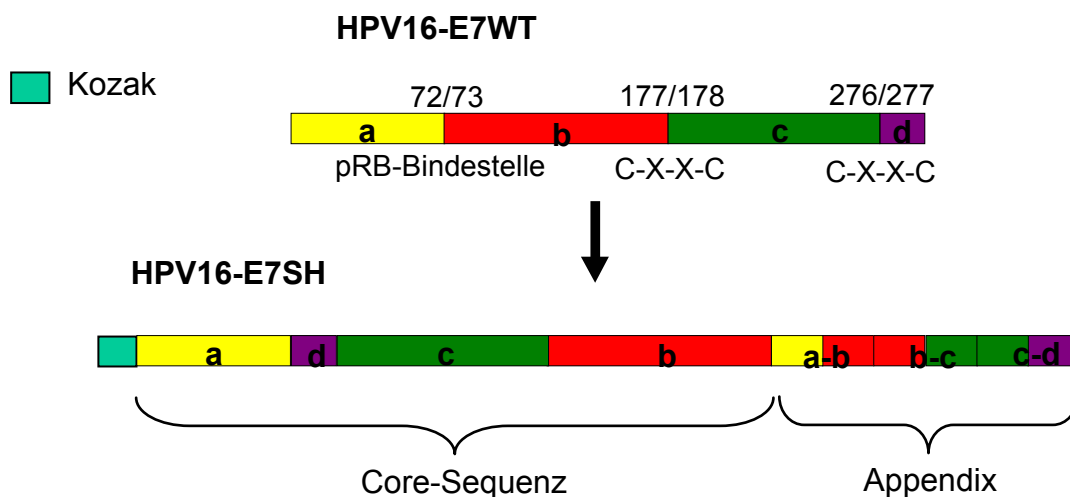


den Einsatz in Entwicklungsländern, wo das Zervixkarzinom besonders häufig vorkommt, äußerst interessant. (3) Außerdem werden durch Applikation einer DNA-Vakzine lang anhaltende Immunantworten induziert (Wolff et al. 1992). (4) DNA-Impfstoffe können wiederholt zum Boosten eingesetzt werden, da sie keine unerwünschten Immunreaktionen gegen weitere Bestandteile des Impfstoffes verursachen (Ji et al. 1999, Liu 1998). (5) Darüber hinaus sind sie auf DNA-Ebene leicht modifizierbar.

Die Strategie der DNA-Immunisierung wurde im HPV-Bereich bisher u.a. für das E7-Onkogen des HPV-Typs 16 untersucht. Da es sich bei den E7-Genen der HR-HPV-Typen um Onkogene handelt, ist es ethisch nicht vertretbar, diese im humanen Bereich zu applizieren. Es wurden verschiedene Versuche unternommen, diese onkogenen Eigenschaften zu inaktivieren. An den Stellen des E7-Onkogens, die in Zusammenhang mit den transformierenden Eigenschaften stehen, wurden Punktmutationen eingefügt (Shi et al. 1999, Smahel et al. 2001). Andere Forschergruppen versuchten mittels MHC-Restriktion einzelne Epitope zu verändern (Doan et al. 2000, Velders et al. 2001). Alle diese Experimente gehen mit dem Verlust natürlicher Epitope einher und sind somit potentiell mit einer Verringerung der Immunisierungs-Effektivität verbunden.

Es wurde deshalb eine Strategie entwickelt, welche die transformierenden Eigenschaften des E7-Gens eliminiert, jedoch keine potentiellen natürlich vorkommenden Epitope zerstört (Öhlschläger et al. 2006). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein rearrangiertes („geschuffeltes“) Onkogen seine transformierenden Eigenschaften verliert. In einer „Proof-of-Principle“-Studie wurde das E7-Wildtyp (E7WT)-Onkogen von HPV16 an drei Stellen geschnitten und die so entstandenen vier Fragmente in veränderter Reihenfolge wieder aneinandergesetzt („Core-Element“). Damit es an den Schnittstellen nicht zum Verlust von CTL-Epitopen kommt, wurde der aus den Überlappungen der Schnittstellen bestehende „Appendix“ an das „Core-Element“ angefügt (Osen et al. 2001). Mit diesem artifiziellen E7SH-Gen wurden Immunisierungsexperimente an C57/BL6-Mäusen durchgeführt. Milzzellen immunisierter Tiere konnten eine spezifische Lyse von Target-Zellen im Chrom- Freisetzungs-Assay vermitteln, die mit den authentischen HPV16-E7 transfiziert waren. In Agar-Transformations-Assays wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu HPV16-E7WT-Transfektionen die mit den HPV16-E7SH transfizierten Mausfibroblasten-Zelllinien keine Foci-Bildung zeigten. Es wurde eine unveränderte Immunogenität der rearrangierten Version des Onkogens mit dem Verlust der transformierenden Eigenschaften des E7-Wildtyp verknüpft (Osen et al. 2001). Mit besonderem Augenmerk auf die Sicherheit in der klinischen Anwendung wurde eine zweite Version des E7SH geschaffen (Öhlschläger et al. 2003). Hierzu wurden die Schnittstellen exakt innerhalb der pRB-Bindestelle (Nukleotide 72/73)

sowie den beiden C-X-X-C Motiven (Nukleotide 177/178 bzw. 276/277) eingefügt. Weiterhin wurde im „Core-Element“ eine Kodon-Optimierung für das humane System vorgenommen (nicht jedoch in den redundanten Nukleotid-Sequenzen des Appendix), womit das Risiko von intramolekularen Rekombinationen (Verhinderung der Entstehung der E7-Wildtyp-Form) verringert werden sollte. Zur Immunogenitätssteigerung wurde vor das E7SH-Gen die Kozak-Sequenz eingefügt, welche zu einer Steigerung der Translation führt (Kozak 1991, Steinberg et al. 2005, siehe Abb. 2/3).



**Abb. 2/3: Generierung der HPV16-E7SH („Shuffled“) Versionen. (Öhlschläger et al. 2003)**

Das Wildtyp-HPV16-Gen (oben) wurde inmitten der pRB-Bindestelle (Nukleotide 72/73) sowie den beiden C-X-X-C Motiven (Nukleotide 177/178 und 276/277) geschnitten, die mit den transformierenden Eigenschaften des E7-Onkogens assoziiert sind. Die somit entstandenen vier Segmente a, b, c und d wurden rearrangiert („geschuffelt“) und bilden im artifiziellen HPV16-E7SH-Gen das „Core-Element“ (unten) mit der Sequenzfolge a, d, c, b. Damit keine potentiellen CTL-Epitope durch die Segmentierung verloren gehen, wurden die Übergänge in beide Richtungen der Schnittstellen (2x 27 Nukleotide = 2x 9 Aminosäuren) als sogenannter „Appendix“ an das „Core-Element“ angefügt. Um die Translation des HPV16-E7SH-Gens zu steigern, wurde unmittelbar vor dem Gen die Kozak-Sequenz eingefügt.

Da es eine Diskrepanz bezüglich der Intensität der induzierten Immunantwort nach DNA-Vakzinierung im murinen Modell auf der einen und größeren Tieren bzw. Menschen auf der anderen Seite gibt (Gregersen 2001, Johnston et al. 2002), werden zahlreiche Anstrengungen unternommen, eine DNA-Vakzine im murinen Modell hinsichtlich ihrer Immunogenität zu optimieren. In dieser Arbeit wurden „adjuvante Gene“ gleichzeitig mit den HPV-Antigenen appliziert, welche die TH<sub>1</sub>-Immunantwort sowie die CTL-Aktivität steigern (Scheerlink 2001, Kusakabe et al. 2000).

## 2.8. Zielstellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zum einen verschiedene „adjuvante Gene“ zusammen mit dem HPV16-E7SH-Konstrukt appliziert werden. Hierzu werden die adjuvanten Gene jeweils in den gleichen Vektor wie das HPV16-E7SH eingefügt. Die Expression der adjuvanten Gene soll anschließend mittels Western Blot, Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und Northern Blot nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der zellulären Immunantwort werden *in vitro* IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays sowie  $^{51}$ Chrom-Freisetzungs-Assays durchgeführt. Weiterhin soll die Auswirkung der gleichzeitigen Applikation von adjuvanten Genen im Rahmen von Tumor-Regressions-Experimenten *in vivo* untersucht werden.

Zum anderen soll das HPV16-E7SH in die Vektoren CpG50 und CpG16 eingefügt werden. Diese Vektoren besitzen 50 (CpG50) bzw. 16 (CpG16) CpG-Motive, die für sich alleine schon in der Lage sind, die Immunantwort zu steigern. Im Gegensatz zum pTHamp-Vektor werden die CpG-Vektoren bereits in Phase-1-Studien am Menschen eingesetzt. In den Versuchen soll die Immunantwort der CpG-Vektoren im Vergleich zum pTHamp-Vektor quantifiziert werden. Hierzu werden IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays und  $^{51}$ Chrom-Freisetzungs-Assays (*in vitro*) sowie Tumor-Regressions-Experimente (*in vivo*) durchgeführt.

### **Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Fragen geklärt werden:**

- a) Lässt sich *in vitro* eine Steigerung der zellulären Immunantwort nach Ko-Applikation von adjuvanten Genen (IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) mit dem HPV16-E7SH-DNA-Konstrukt detektieren (Quantifizierung im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays sowie  $^{51}$ Chrom-Freisetzungs-Assays)?
- b) Lässt sich *in vivo* eine Steigerung der zellulären Immunantwort nach Ko-Applikation von adjuvanten Genen (IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$ ) mit dem HPV16-E7SH-DNA-Konstrukt detektieren (Quantifizierung in Tumor-Regressions-Experimenten)?
- c) Lässt sich *in vitro* eine Steigerung der zellulären Immunantwort nach Applikation der Konstrukte CpG50-HPV16-E7SH und CpG16-HPV16-E7SH im Vergleich zu pTHamp HPV16-E7SH detektieren (Quantifizierung im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays sowie  $^{51}$ Chrom-Freisetzungs-Assays)?
- d) Lässt sich *in vivo* eine Steigerung der zellulären Immunantwort nach Applikation der Konstrukte CpG50-HPV16-E7SH und CpG16-HPV16-E7SH im Vergleich zu pTHamp HPV16-E7SH detektieren (Quantifizierung in Tumor-Regressions-Experimenten)?

### **3. Methoden**

#### **3.1 Molekularbiologische Methoden**

##### **3.1.1 Restriktionsverdau**

Die Restriktionsendonukleasen des Typs II sowie die Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (Schwalbach, D) bezogen. Die Restriktionsenzyme erkennen die doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen. Diese beinhalten 4 - 6 Basenpaare. Der Schnitt erfolgt durch Hydrolyse der Phosphordiesterbindungen und setzt entweder direkt innerhalb oder in der Nähe der Erkennungssequenz an. Der Phosphatrest am 5'-Ende bleibt zurück. Die Menge, die unter optimalen Reaktionsbedingungen in 60min 1µg des angegebenen Substrates spaltet, wird als Einheit des Restriktionsenzym definiert. Da Glyzerin als ein Hauptbestandteil der Puffer (etwa 50%) ab einer Gesamtkonzentration von 5% die Aktivität der Enzyme sowie die Sequenz-Spezifität negativ beeinflusst, ist darauf zu achten, den Volumenanteil des Enzyms auf 1/10 des Gesamtvolumens zu beschränken. In analytischen Ansätzen wurde etwa 1µg DNA in einem Volumen von 10µl für 2 - 3h bei 37°C verdaut. Der Verdau größerer DNA Mengen (10 - 20µg) zur präparativen Aufreinigung erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100µl in der Regel ü.N. bei 37°C. Die Enzym- und Puffermenge sowie BSA wurden entsprechend den Herstellerempfehlungen eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O auf das gewählte Volumen aufgefüllt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Fragmente zur Kontrolle und Quantifizierung durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

##### **3.1.2 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen**

Die Agarosegele wurden zur Bestimmung der DNA-Konzentration, zur analytischen Auftrennung von Restriktionsverdauen und PCR-Produkten sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet. Für die DNA-Gelelektrophorese wurden 1%ige Agarosegele gegossen. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TBE-Elektrophorese-Puffer gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe von Ethidiumbromid auf eine Endkonzentration von 1µg/ml. Anschließend wurde das Gel abgekühlt und somit ausgehärtet. Den DNA-Proben wurde 1/5 ihres Volumens 6x Gelladepuffer zugegeben und damit die Geltaschen beladen. Die Elektrophorese erfolgte je nach gewünschter Auftrennung über 1 - 4h bei einer Spannung von 60 - 100Volt. Da die Nukleinsäuren der DNA negativ geladen sind, trennen sie sich im elektrischen Feld nach ihrer Größe auf. Diese Größe wurde anhand eines parallel laufenden Molekulargewichtsmarkers (MGM, GeneRuler™ DNA Smart Ladder) bestimmt. Nach dem

Auftrennen wurden die Gele auf einem UV-Leuchttisch bei 254nm Wellenlänge betrachtet und fotografisch dokumentiert. Um das Risiko von Mutationen zu verringern, wurden die zur DNA-Isolierung bestimmten präparativen Gele unter langwelligem, energieärmeren UV-Licht (366nm) ausgewertet und hierbei die gewünschte Bande isoliert.

### **3.1.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Kit**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die zu isolierende DNA-Bande unter langwelligem UV-Licht (366nm) mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelblock erfolgte mittels Qiaex II Gel-Extraktions-Kit (siehe 7.2.3.6).

### **3.1.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA**

Die DNA-Konzentration nach einer Maxi-Präparation sowie nach einer DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde durch Abschätzen anhand des MGM bei den obligatorischen Kontroll-Agarosegelen bestimmt. Die spektrophotometrische Methode wurde zur DNA-beziehungsweise RNA-Konzentrationsbestimmung in wässriger Lösung verwendet. Hierbei wurden 10µl der zu bestimmenden DNA mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 500µl verdünnt und die Absorption der Nukleinsäuren bei 260nm und 280nm gemessen. Die Absorption von 1 bei 260nm (optische Dichte 260, OD<sub>260</sub>) entspricht einer DNA-Konzentration von 50µg/ml beziehungsweise einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280nm (OD<sub>280</sub>) zeigen, ist der gemessene Wert in diesem Wellenlängenbereich ein Maß für die Verunreinigung der DNA. Somit entspricht ein OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Quotient zwischen 1,8 und 2,0 einer sehr reinen DNA-Lösung.

### **3.1.5 Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden**

Mit Hilfe der Kälberdarmphosphatase (CIP) können glatte sowie auch überstehende 5'-DNA-Enden dephosphoryliert werden. Hiermit wird das vorzeitige Schließen eines linearisierten Plasmides verhindert. Direkt nach dem Restriktionsverdau wurde die zu dephosphorylierende DNA in CIP-Puffer in einer Endkonzentration von 0,5µg/10µl Puffer aufgenommen. Zum Schneiden von 5'-überstehenden Enden wurden 0,5U CIP (10U/µl) je µg DNA zugesetzt und für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um eine Dephosphorylierung der Insert-DNA bei der Ligation zu verhindern, wurde die Aktivität der Phosphatase durch ein 15minütiges Erhitzen bei 75°C unwirksam gemacht. Die 5'-dephosphorylierte DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

### 3.1.6 Ligation linearer DNA-Fragmente

Zur Bildung von Phosphordiesterbindungen zwischen dem 3'-Hydroxyende und der 5'-Phosphatgruppe wurde die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase verwendet. Die Konzentration der benötigten DNA wurde mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{ng Insert} = \frac{\text{DNA-Gehalt Plasmid} \times \text{kb Größe Insert}}{\text{kb Größe Plasmid}} \times \text{molares Verhältnis} \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Das molare Verhältnis von Insert zu Plasmid sollte idealerweise 5: 1 betragen. Die Plasmid- und Insert-DNA wurde mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 15µl gebracht. Um potentiell vorhandene sekundäre DNA-Strukturen aufzulösen, wurde das DNA-Gemisch 5min bei 45°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde auf Eis weitergearbeitet. Es wurde 1µl der T<sub>4</sub>-Ligase (1U/µl) und 4µl 5x Ligasepuffer hinzu gegeben (Volumen 20µl) und mindestens 4h bei 16°C inkubiert. Eine Probe des Ligationsansatzes wurde im Agarosegel überprüft und der Rest bei -20°C gelagert oder in kompetente Bakterienzellen transformiert (siehe 3.1.10 und 3.1.11).

### 3.1.7 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Verunreinigungen (Proteine, Salze und Lipide) aus Nukleinsäuregemischen diente die Phenol-Chloroform-Extraktion. Durch die Phenolwirkung denaturieren die Proteine und können somit anschließend, ebenso wie die Lipide, mit dem Phenol aus dem Gemisch entfernt werden. Die DNA wird ausgefällt, indem Ethanol der hydrophilen DNA die sie umgebenden H<sub>2</sub>O-Moleküle entzieht. Hierzu wurde der DNA-Lösung im gleichen Verhältnis Phenol/ CIA sowie zusätzlich 200µl TE-Puffer hinzu gegeben. Dieser Ansatz wurde für 30sek gevortext und schließlich für 5min bei 14.000UPM (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, nochmals 400µl CIA zugegeben und erneut extrahiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur DNA-Fällung das 2,4-fache Volumen eiskalten 98%igen Ethanols zugefügt und für 2h bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 30min bei 4°C und 14.000UPM zentrifugiert und dekantiert. Um mitgefällte Salze zu entfernen, wurde das Gemisch mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 15min bei 4°C und 14.000UPM zentrifugiert. Danach wurde nochmals dekantiert. Den Rest des Alkohols ließ man über etwa 20min hinweg abdampfen. Zum Schluss wurde das DNA-Pellet in 50µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst und die DNA bei -20°C gelagert.

### **3.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien zur Transformation durch Elektroporation**

Bakterien, welche DNA effizient durch Elektroporation aufnehmen sollen, müssen kompetent gemacht werden. Hierzu wurde am Vorabend eine Übernachtskultur (ÜNK) von *E. coli* DH5 $\alpha$  in 5ml LB-Medium ohne Ampizillinzusatz angelegt. Die ÜNK wurde in 500ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Ampizillin überführt und anschließend auf einem Flachbettschüttler bei 200UPM und 37°C inkubiert. Um festzustellen, wann sich die Bakterien in der exponentiellen Phase befinden, sind regelmäßig OD<sub>595</sub>-Messungen durchgeführt worden und der Zeitpunkt OD<sub>595</sub> = 0,5 bestimmt. Jetzt wurde die Bakteriensuspension bei 4°C und 4.000UPM (XL-100 Ultrazentrifuge) für 10min zentrifugiert, das Medium dekantiert und anschließend die Zellen in eiskaltem 10%igem Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden für 20min auf Eis inkubiert und dann erneut bei 4°C und 4.000UPM für 1min zentrifugiert. Das Prozedere wurde ein weiteres Mal mit Glycerol wiederholt (resuspendieren, inkubieren, zentrifugieren). Nach dem erneuten Dekantieren wurde das Pellet, je nach Größe in einer geeigneten Menge 10%igem Glycerol resuspendiert, aliquotiert (40 $\mu$ l) und bei -80°C gelagert.

### **3.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien zur chemischen Transformation**

Zur Herstellung kompetenter Bakterien für die chemische Transformation wurden 200ml LB-Medium mit 200 $\mu$ l einer ÜNK (Einzelkolonie von *E. coli* DH5 $\alpha$ ) beimpft und anschließend auf einem Flachbettschüttler bei 200UPM und 37°C inkubiert. Mittels regelmäßiger OD-Messungen wurde der Zeitpunkt bestimmt, bei dem sich ein OD<sub>550</sub>-Wert von 0,3 einstellte. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die Bakterienzellen für 10min bei 3.000UPM (XL-100 Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 100ml Lösung 1 (siehe, wie auch alle anderen aufgeführten Lösungen, 7.2.3.16) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, anschließend in 100ml eiskalter Lösung 2 gelöst und für 60min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 2ml Lösung 3 gelöst und die Suspension in 1,5ml Reaktionsgefäße (auf -80°C vorgekühlt) zu je 200 $\mu$ l aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### **3.1.10 Bakterielle Transformation durch Elektroporation**

Mit Hilfe der Elektroporation wird Plasmid-DNA schnell und effizient in Bakterien eingeschleust. Hierzu wurden 0,2 $\mu$ g DNA auf den Boden einer auf Eis vorgekühlten Elektroporations-Küvette pipettiert und 50 $\mu$ l der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien

hinzugegeben (siehe 3.1.8). Die Elektroporation erfolgte mittels GenePulser®II Elektroporationssystem bei einem Impuls von 2,5kV, 25µF und 200Ohm Schutzwiderstand. Der Zeitraum, in dem die Spannung auf 1/e abfällt, betrug im optimalen Fall 4ms (Zeitkonstante  $\tau$ ). Umgehend nach der Elektroporation wurde 1ml eisgekühltes LB-Glukose-Medium zugegeben. Der gesamte Inhalt wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 1h bei 37°C inkubiert. Danach wurden Verdünnungsstufen der Bakterienlösung im Bereich 1: 10 bis 1: 10.000 auf LB-Agarplatten mit Ampizillin oder Kanamycin ausplattiert. Die angeimpften LB-Agarplatten wurden ü.N. bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien durch Plasmidschnellaufarbeitung (siehe 3.1.12), analytischen Restriktionsverdau (siehe 3.1.1) und Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.2) analysiert.

### **3.1.11 Chemische bakterielle Transformation**

Ein weiteres Verfahren, DNA-Plasmide schnell und effizient in Bakterien einzuschleusen, ist die chemische Transformation. Hierzu wurden 0,5µg der Plasmid-DNA zusammen mit 200µl der auf Eis aufgetauten, chemisch kompetenten Bakterien in ein Reaktionsgefäß pipettiert, kurz gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde für 2min ein Hitzeschock bei 42°C (Thermocycler comfort) durchgeführt und sofort danach 600µl vorgekühltes LB-Medium zugegeben. Nach 2minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien 1h bei 37°C und 350UPM inkubiert. Während dieser Zeit bildete sich die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz aus. Es wurden Verdünnungsstufen der Bakterienlösung im Bereich 1: 10 bis 1: 10.000 auf LB-Agarplatten mit Ampizillin oder Kanamycin ausplattiert und ü.N. bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden einzelne Klone gepickt, eine ÜNK angelegt und die gewachsenen Kolonien durch Plasmidschnellaufarbeitung, analytischen Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese analysiert.

### **3.1.12 Plasmidschnellaufarbeitung (Plasmid-DNA-Minipräparation)**

Die Plasmidschnellaufarbeitung liefert relativ kleine Mengen Plasmid-DNA in einer ausreichenden Qualität speziell für analytische Restriktionsverdaue und Transformationen. Am Vorabend wurden einzelne Bakterienkolonien von den LB-Agarplatten in jeweils 5ml LB-Medium mit Ampizillin oder Kanamycin (je nach Resistenz) überführt und ü.N. (37°C, 200UPM) auf dem Schüttler kultiviert. Zur Kryokonservierung wurden am nächsten Tag 1,7ml der gewachsenen Kultur mit 0,3ml reinem Glycerol in 2ml Kryokonservierungsröhrchen gut vermischt und bei -80°C gelagert. Zur Mini-Präparation wurden 2ml der Bakteriensuspension abgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses



wurde für 2min bei 4°C und 14.000UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 100µl Lösung 1 (siehe, wie auch die anderen aufgeführten Lösungen, 7.2.3.5.1) und 200µl Lösung 2 resuspendiert. Das Gemisch wurde vorsichtig und vollständig homogenisiert und für 5min bei RT inkubiert. Es folgten die Addition von 150µl eiskalter Lösung 3 und eine Eis-Inkubation von 5min. Das Bakterienlysats wurde 10min bei 14.000UPM zentrifugiert. Die DNA (im Überstand) wurde in ein neues Gefäß überführt. Die als Pellet abgesetzten Zellbestandteile wurden verworfen. Zur Denaturierung wurde dem DNA-haltigen Überstand 0,9ml 96%iger eiskalter Ethanol hinzugegeben und für 5min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde für 10min bei 4°C und 14.000UPM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen wurde dem Pellet 1ml 70%iger Ethanol hinzugefügt und erneut 2min bei 4°C und 14.000UPM zentrifugiert. Nach vorsichtigem Dekantieren wurde das DNA-Präzipitat für etwa 5 - 10min im 37°C-Raum getrocknet. Danach wurde es in 50µl TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O gelöst und nach Zugabe von 2µl RNase (10mg/ml) bei -80°C gelagert. Zur Kontrolle der gewonnen Plasmid-DNA wurde mit 1µl der Lösung ein analytischer Restriktionsverdau und anschließend eine gelelektrophoretische Auftrennung durchgeführt.

### **3.1.13 Plasmidgroßaufarbeitung (Plasmid-DNA-Maxipräparation)**

Für Klonierungen, Transfektionen, Immunisierungen und Sequenzanalysen benötigt man größere Plasmid-DNA-Mengen in sehr reiner Qualität ( $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient = 1,8 - 2,0). Mit Ampizillin oder Kanamycin (je nach Resistenz) angereichertes LB-Medium wurde mit 200µl Bakterienkultur, die das gewünschte Plasmid enthält und bei -80°C in Glycerin gelagert wurde, angeimpft. Die Bakterien wurden ü.N. bei 37°C und 200UPM auf dem Schüttler kultiviert. Die entstandene Bakteriensuspension wurde 15min bei 4°C und 4.000UPM zentrifugiert (XL-100 Ultrazentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10ml Resuspensionspuffer P1 (siehe, wie auch die anderen aufgeführten Puffer, 7.2.3.5.2) aufgelöst. Anschließend wurden 10ml Lysispuffer P2 zugefügt, vorsichtig homogenisiert und 5min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 10ml vorgekühlter Neutralisierungspuffer P3 hinzugefügt, gemischt und für 20min auf Eis inkubiert. Nun wurde das Gemisch für 30min bei 4°C und bei 6.000UPM zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde auf die mit 10ml Equilibrierungspuffer (QBT) vorbereitete Qiagen-Kartusche gegeben. Man wartete bis die Flüssigkeit aufgrund der Gravitation durch die Kartusche gelaufen ist. Dann wurde die Qiagen-Kartusche zweimal mit je 30ml Waschpuffer (QC) gewaschen und abschließend die DNA mit 15ml Elutionspuffer (QF) eluiert. Zur Fällung und Aufreinigung wurde die DNA mit 12ml Isopropanol präzipitiert und 45min bei 4°C und 4.000UPM

(Megafuge 1.0 R) zentrifugiert. Zum Abschluss wurde das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut 30min bei 4°C und 4.000UPM zentrifugiert. Das bei RT getrocknete Pellet wurde nun in 500µl H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die DNA wurde anschließend zum Klonieren, für Transfektionen und Sequenzanalysen sowie zum Immunisieren der Mäuse eingesetzt.

### **3.1.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist in der Lage, gezielt bestimmte DNA-Stücke zu amplifizieren. Hierzu wurden speziell hergestellte Primer (siehe 7.2.3.2) verwendet, welche teilweise komplementär zu den Ausgangs-DNA-Strängen („template“) sind und am Rande des zu amplifizierenden DNA-Stückes binden. Eine PCR verläuft in vielfachen Zyklen, die jeweils aus Denaturierung (denaturation), Anlagerung (annealing) und Verlängerung (elongation) bestehen. Die Denaturierung verläuft hitzevermittelt und führt dazu, dass die zu amplifizierende DNA einzelsträngig (ssDNA) vorliegt. Im nächsten Schritt, dem Annealing, lagern sich die Primer an die komplementäre Nukleotidsequenz der Ausgangs-DNA an. Der dritte Schritt beinhaltet das Binden der thermostabilen DNA-Polymerase an die Primer und somit die Synthese der zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitte. Mit dem nun folgenden neuen Zyklus kommt es erneut zur Denaturierung. Die Doppelstränge aus Template und neu synthetisierter DNA werden getrennt. Pro Doppelstrang aus Template und neu synthetisiertem DNA-Strang entstehen somit zwei neue DNA-Ausgangsstücke.

### **3.1.15 Amplifizierung der HPV16-E7SH-, IL-2-, GM-CSF- und IFN- $\gamma$ -Gene**

Um die Wahrscheinlichkeit der bei Polymerase-Ketten-Reaktionen vorkommenden unerwünschten Mutationen zu senken, wurde eine DNA-Polymerase mit Proofreading-Aktivität eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen Polymerasen weist diese eine um den Faktor 8 höhere Lesegenauigkeit auf (Lundberg et al. 1991). Dies wird durch gebundene Antikörper erreicht, welche die Aktivität und die 3'-5'-Exonuklease (Proofreading)-Funktion der Polymerase solange unterbinden, bis diese durch einen initialen Hitzeschritt der PCR-Maschine denaturiert werden („Hotstart“). In dieser Arbeit wurde zur Amplifizierung der HPV16-E7SH-, IL-2-, GM-CSF- und IFN- $\gamma$ -Gene die Herkulase-Hotstart DNA-Polymerase eingesetzt. Mit Hilfe der PCR wurden den amplifizierten Genen (HPV16-E7SH, IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$ ) am 5'-Ende Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Hind III, Not I, BamH I eingefügt. Am 3'-Ende wurden die Sequenzen für die Schnittstellen Xba I, EcoR I, Xho I und Pst I angehängt. Unmittelbar vor dem Start-Kodon wurde die Kozak-Sequenz (5'-CCC

GCC GCC ACC-3') eingebaut. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen in 0,2ml Reaktionsgefäßen durchgeführt:

Pipettierschema:

Template-DNA (1 - 10ng)	2	µl
Primer Vorwärts (100pmol)	1	µl
Primer Rückwärts (100pmol)	1	µl
10x PCR-Puffer	5	µl
Herculase-DNA-Polymerase (5U/µl)	1	µl
dNTPs (2mM)	5	µl
H <sub>2</sub> O bidest	35	µl
Gesamtvolumen	50	µl

Die Amplifizierung der Gene wurde unter folgenden PCR-Konditionen vorgenommen:

1. initiale Denaturierung	95°C	2	min	} 35 Zyklen
2. Denaturierung	95°C	30	sec	
3. Annealing	55°C	1	min	
4. Elongation	72°C	90	sec	
5. Elongation	72°C	5	min	

Nach der Beendigung der 35 PCR-Zyklen wurde 1µl des amplifizierten Produktes entnommen und im analytischen Gel auf seine richtige Größe hin überprüft. Zur Entfernung restlicher dNTPs sowie von PCR-Salzen wurde das PCR-Reaktionsgemisch einer Phenol-Chloroform-Fällung (siehe 3.1.7) unterzogen oder auf ein präparatives Gel aufgetragen. Aus dem Gel wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels Gel-Extraktion isoliert und aufgereinigt. Diese aufgereinigte DNA wurde dann in den pTHamp-Vektor ligiert (3.1.6).

### 3.1.16 Transkriptionsnachweis mittels PCR

Zur Verifizierung der Transkription der HPV16-E7SH-, IL-2-, GM-CSF- und IFN-γ-Gene in den transfizierten murinen Tumorzellen wurden der Northern Blot (siehe 3.2.3) und die Reverse Transkriptase-PCR eingesetzt. Die nach der RNA-Extraktion (siehe 3.2.1) aus der RNA gewonnene cDNA wurde zum Transkriptionsnachweis in folgender PCR verwendet:

Pipettierschema für 1x Ansatz

dNTPs (2mM)	3	µl
Primer Hin (10pmol/µl)	1,25	µl
Primer Rück (10pmol/µl)	1,25	µl
10x Puffer + 15mM Mg Cl <sub>2</sub>	2,5	µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,25	µl
DMSO (99,9%)	1,25	µl
Ampli Taq Gold (5U/µl)	0,25	µl
cDNA	1	µl

⇒ verwendete Primer siehe 7.2.3.2

PCR-Programm zum Nachweis der E7SH-, IL-2-, GM-CSF- und IFN- $\gamma$ -Gene

1. initiale Denaturierung	94°C	10	min	} 39 Zyklen
2. Denaturierung	94°C	15	sec	
3. Annealing	54°C	30	sec	
4. Elongation	74°C	90	sec	
5. Elongation	72°C	8	min	

Zur Überprüfung der nachzuweisenden Transkription sind 5 $\mu$ l des PCR-Reaktionsansatzes mit Hilfe eines analytischen Gels aufgetrennt und die Banden des Gels auf ihre korrekte Größe hin überprüft worden.

### 3.2 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

#### 3.2.1 RNA-Extraktion aus transfizierten murinen Tumorzellen mittels TRIzol-Reagent

Ein frisch geerntetes oder ein tiefgefrorenes Zellpellet wurde in 1ml TRIzol durch gründliches Vortexen homogenisiert. Zur Effizienzerhöhung des Zellaufbruchs wurde das homogenisierte Lysat ü.N. bei -80°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat nach Zugabe von 200 $\mu$ l Chloroform 15min gevortext und 15min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 15min bei 13.000UPM und 4°C (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die oberste Schicht des entstandenen 3-Phasengemisches enthielt die RNA. Diese RNA-Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500 $\mu$ l Isopropanol für 10min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde 8min bei 4°C und 14.000UPM zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1ml 70%igem Ethanol durch Vortexen gelöst. Nun wurde erneut für 5min bei 4°C und 10.000UPM zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes und dem Abdampfen des Ethanols wurde das Pellet in 50 $\mu$ l RNase-freiem Wasser (DEPC-bidest) aufgenommen. Hierzu wurde die RNA für 10 - 15min bei 56°C inkubiert und die RNA vollständig gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mittels Spektrophotometer bestimmt. Die erhaltene RNA wurde bei -80°C gelagert und zum Transkriptionsnachweis im Northern Blot (siehe 3.2.3) und der RT-PCR (siehe 3.2.4) verwendet.

#### 3.2.2 Gelelektrophorese von RNA in Agarosegelen

Die Gelelektrophorese der RNA wurde mittels eines 1%igen Agarosegels in 1x MOPS-Puffer durchgeführt und die RNA anschließend mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert. Hierzu wurden 5 $\mu$ g der extrahierten RNA in ein Endvolumen von 6,5 $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgenommen und 13,5 $\mu$ l RNA-Probenpuffer (siehe 7.2.3.14) hinzu pipettiert. Um

vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen, wurde der Ansatz für 10min bei 65°C erhitzt. Danach erfolgte auf Eis die Zugabe von 3µl RNA-Ladepuffer und die RNA wurde 1h bei 80Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Im UV-Licht wurden daraufhin die sichtbaren 18S- und 28S-Banden (S = Svedberg-Einheit) der ribosomalen RNA sowie der RNA-Marker markiert.

### **3.2.3 Northern Blot**

Der Northern Blot dient dem RNA-Nachweis. Die Methode besteht aus der Übertragung von im Agarosegel aufgetrennter RNA-Moleküle auf Nylonmembranen. Spezifische Sequenzen werden durch Hybridisierung mit einer speziell markierten Sonde nachgewiesen.

#### **3.2.3.1 Der Blotvorgang**

Zur näheren Spezifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter RNA wird diese vom Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert. Hierzu wurde das Gel dreimal 10min in 10x SSC gewaschen und danach mittels eines Vakuum-Blotters auf eine ebenfalls mit 10x SSC (15min) äquilibriumierte, positiv geladene Nylonmembran transferiert. Der Vorgang des Blottens dauerte etwa 60 - 90min. Hierbei wurde der Druck durch den Vakuum-Regulator bei 5mmHg gehalten. Die Geldaschen der RNA-Marker sowie die 18S- und 28S-Banden wurden mit einem Bleistift auf der Membran markiert. Diese wurde für 10min in 2x SSC gewaschen und im GS Gene Linker (BioRad, Hercules, CA, USA) mit UV-Licht bestrahlt („crosslinken“). Durch diese UV-Bestrahlung wurde die RNA kovalent auf der Membran gebunden. Nun wurde die Membran zwischen zwei angefeuchteten Filtern bei -80°C gelagert oder unmittelbar im Anschluß die Vorhybridisierung durchgeführt.

#### **3.2.3.2 Radioaktive Markierung der Sonden-DNA mit $\alpha^{32}$ -dATP**

Alle Arbeiten mit Radioaktivität wurden nach einer entsprechenden Belehrung im Umgang mit Radioaktivität hinter einem Plexiglasschild ausgeführt. Zum Nachweis, dass die RNA der transfizierten murinen Tumorzellen auf der Nylonmembran die richtige HPV16-E7SH-, IL-2-, GM-CSF- oder IFN- $\gamma$ -RNA enthält, wurden spezifische Sonden für jedes Konstrukt radioaktiv markiert und mit der Membran hybridisiert. Die entsprechenden Gene (IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$ ) wurden aus dem pTHamp-Vektor ausgeschnitten. Hierzu wurden im Restriktionsverdau für IFN- $\gamma$  und GM-CSF die Enzyme Hind III und Xba I und für IL-2 die Enzyme Bam HI und Xba I verwendet. Mittels Qiaex II Gel-Extraktions-Kit wurde die gewünschte DNA-Bande nach der Gelelektrophorese aus dem Gel entfernt. Mit Hilfe des

„Random Primed DNA Labeling KIT“ wurde die DNA-Sonde mit  $\alpha^{32}$ -dATP markiert. Genutzt wurden Hexanukleotide, welche die Sonden-DNA an vielen Stellen binden. Es wird somit der Einbau des radioaktiven ATP in die Sonde gewährleistet. Das beigefügte Kleenow-Fragment der DNA-Polymerase I katalysiert die Synthese der radioaktiv markierten DNA-Sonde. Diesem Kleenow-Fragment fehlt die 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität. Das heißt, dass das radioaktive Produkt ausschließlich durch Primer-Verlängerung (extension) und nicht durch Nick-Translation gebildet wird.

#### Ansatz für das Random Primed Labeling:

50ng Insert-DNA in 11,5µl H<sub>2</sub>O Endvolumen aufnehmen

⇒ 10min bei 99°C denaturieren, kurz zentrifugieren und auf Eis stellen

Zugabe von:	dGTP, dCTP, dTTP (2mM)	je	1	µl
	Hexanukleotide (100µl in 10x Puffer)		2	µl
	$\alpha^{32}$ PdATP (3000 Ci/mmolmM)		2,5	µl
	Klenow-Fragment (2U/µl)		1	µl

⇒ 30min bei 37°C inkubieren (Thermocycler comfort)

Um unspezifische radioaktive Signale bei der Hybridisierung mit der Membran zu vermeiden, musste die DNA-Sonde von nicht eingebauten radioaktiven  $\alpha^{32}$ dATP gereinigt werden. Dies geschah nach den Angaben des Herstellers über eine Säulenchromatographie (Quick Spin™Columns, Roche, Indianapolis, USA). Die Effektivität des Einbaus der Radioaktivität (in dpm) wurde abschließend mit einem Counter-Messgerät gemessen.

### **3.2.3.3 RNA-Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA-Sonde**

Zur Charakterisierung der auf die Nylonmembran geblotteten RNA wurde diese mit der hergestellten radioaktiven Sonde hybridisiert. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde die Nylonmembran mit t-RNA vorhybridisiert:

#### Vorhybridisierungslösung für 10ml (0,1 ml/cm<sup>2</sup>)

Lösung 1	5	ml	100% Formamid
	100	µl	t-RNA (10mg/ml)
	⇒ 5min bei RT inkubieren und Zugabe von 1ml 10%iges SDS		
Lösung 2	2,5	ml	20x SSC
	200	µl	50x Denhardt
	500	µl	1 M NAPP
	700	µl	H <sub>2</sub> O

Beide Lösungen wurden kurz vor ihrem Einsatz gemischt und zusammen mit der Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre aus Glas überführt. In einem Hybridisierungssofen wurde der gesamte Ansatz ü.N. bei 42°C und bei 5 - 7UPM rotierend

inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Vorhybridisierungslösung ohne einen Waschschrift gegen folgende Hybridisierungslösung ausgetauscht:

Hybridisierungslösung für 5ml (0,1ml/cm<sup>2</sup>)

Lösung 1	2,5 ml	100% Formamid
	50 µl	t-RNA (10mg/ml)
	50 µl	$\alpha^{32}\text{P}$ -DNA (0,3-3x10 <sup>6</sup> dpm)
	⇒ 5min bei RT inkubieren und Zugabe von 500 µl 10%iges SDS	
Lösung 2	1,25 ml	20x SSC
	100 µl	50x Denhardt
	100 µl	1M NAPP
	450 µl	H <sub>2</sub> O

Kurz vor ihrem Gebrauch wurden beide Hybridisierungslösungen gemischt und gemeinsam mit der Nylonmembran in eine Hybridisierungsröhre überführt. Die Hybridisierung wurde für 48h bei 42°C und 5 - 7UPM rotierend in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. Nach 48h Inkubation wurde die Membran für 30min mit 200ml vorgewärmtem Waschpuffer (2x SSC/0,1% SDS) bei 68°C und 12 - 15UPM rotierend im Hybridisierungsofen gewaschen. Der 2. und 3. Waschschrift wurde jeweils für 30min mit dem gleichen Waschpuffer wie der 1. in einer Wanne im Schüttelwasserbad durchgeführt. Der entstehende radioaktive Abfall wurde in dafür vorgesehene Behälter entsorgt. Nach dem Waschen wurde die Membran in einen in Waschpuffer getränkten Filter gelegt und mit Frischhaltefolie luftblasenfrei eingepackt. Die Exposition der Membran erfolgte in einer mit Verstärkerfolien versehenen Filmkassette. Die Membran wurde in der Kassette platziert und ein Kodak-Röntgenfilm X-OMAT aufgelegt. Je nach Signalintensität betrug die Expositionsdauer 3 bis 7 Tage. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte in der Dunkelkammer bei folgenden Bedingungen:

Filmentwicklung:

5 - 10 min	Entwicklerlösung	→	10 sek	Waschlösung
5 - 10 min	Fixierlösung	→	10 sek	Waschlösung

Nach dem Waschen wurde der Film im 37°C-Raum getrocknet.

### 3.2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Der Vorgang der Reversen Transkription schreibt mRNA aus dem RNA-Gesamtextrakt (siehe 3.2.1) in cDNA (complementary DNA) um. Die neu synthetisierte cDNA wurde anschließend als Template für eine PCR (siehe 3.1.16) verwendet. Mittels der PCR kann man die Transkription der adjuvanten Gene in den transfizierten murinen Tumorzellen nachweisen. Die für die Reverse Transkription verwendeten CDS-Primer (Thermo Hybaid, Franklin, MA, USA) binden spezifisch an den Poly-Adenin-Schwanz der mRNA.

1x Reaktionsansatz (40µl):

Ansatz 1	CDS-Primer (10pmol/µl)	2	µl
	dNTPs (je 10mM)	2	µl
	RNA	2	µg
	H <sub>2</sub> O	ad 25	µl

Ansatz 1 wurde für 1min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Die einminütige Inkubation verhindert unspezifische Wechselwirkungen der RNA-Moleküle untereinander und begünstigt die CDS-Primerbindung.

Ansatz 2	5x Puffer	8	µl
	DTT (0,1M)	4	µl
	RNasin (40U/µl)	1	µl

Ansatz 2 wurde für 5min bei 42°C inkubiert und danach 2µl der Superscript II RNase H Reverse Transkriptase (200U/µl) hinzugegeben. Dem erwärmten Ansatz 2 wurde der auf Eis stehende Ansatz 1 zugegeben und für 50min bei 42 °C inkubiert. Die mRNA diente als Matrize und die Reverse Transkriptase synthetisierte mittels der dNTPs die neue cDNA. Abschließend wurde die Reaktion durch einen 15minütigen Hitzeschritt bei 70°C gestoppt. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert und später zum Transkriptionsnachweis der adjuvanten Gene eingesetzt (siehe 3.1.16).

### 3.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 3.3.1 Proteinextraktion

Zur Gewinnung eines Gesamt-Protein-Extraktes wurden die mit HPV16-E7SH-, IL2-, GM-CSF-, IFN-γ-transfizierten murinen Tumorzellen (RMA) zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Nach vollständiger PBS-Entfernung wurden die Zellen trypsiniert und für 4min bei 1.200UPM (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 1ml 1%iges SDS aufgenommen und für 10min bei 100°C inkubiert. Nun wurde auf Eis weitergearbeitet und dem Zellextrakt 1µl Benzonase (25U/µl) zugegeben. Dieses Enzym spaltet während der folgenden 30minütigen Inkubationszeit die freigesetzte DNA. Das Zellgemisch wurde abschließend für 10min bei 4°C und 12.000UPM zentrifugiert. Die DNA lagert sich nach der Zentrifugation als Pellet ab und das Proteingemisch sammelt sich im Überstand. Dieser Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt photometrisch bestimmt. Das Gesamt-Protein-Extrakt wurde bei -80°C gelagert.



### 3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentrationsbestimmung von Proteinen anhand der Bradford-Methode (Bradford 1976) durchgeführt. Diese Methode arbeitet mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250, der vor allem an basische und aromatische Aminosäuren bindet. Es wurde die Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm (ohne Protein) zu 595nm (mit Protein) spektrophotometrisch detektiert. Hierbei ist die gemessene Extinktion direkt proportional zur vorhandenen Proteinkonzentration der Lösung. Als Eichproteinlösung (Anlegen einer Standardreihe) diente BSA (10mg/ml Stocklösung). Die jeweiligen Werte wurden zur Erstellung einer Eichgeraden verwendet, mit deren Hilfe der Proteingehalt der Proben direkt ermittelt werden konnte. Zum Vermessen der Proben wurden 5ml Bradford-Reagenz (1: 5 verdünnt) mit 100µl Probe bzw. Eichprobenlösung (BSA) gemischt, für 10 - 20min inkubiert und in Plastikküvetten überführt. Die Inkubation diente der Ausbildung des Farbstoff-Protein-Komplexes.

### 3.3.3 Proteinauftrennung mittels Polyacrylamidgel

Zur Auftrennung von Proteinen wurde das diskontinuierliche System nach Lämmli (Lämmli 1970) verwendet. Man benötigt hierbei ein Gel bestehend aus Trenngel (pH 8,8) und einem darüber geschichteten Sammelgel (pH 6,8). Die Aufgabe des Sammelgels ist die Protein-Probe in einer schmalen Bande zu konzentrieren, so dass im Trenngel eine höhere Trennschärfe erreicht werden kann. Die Molekulargewichte der nachzuweisenden Proteine lagen für GM-CSF bei 14kDa, für IFN- $\gamma$  bei 15,6kDa und für IL-2 bei 17kDa, so dass ein 15%iges Trenngel eingesetzt wurde. Es wurden alle Bestandteile des Trenngels (siehe 7.2.3.11) zusammen pipettiert unter der Maßgabe, dass APS und Temed zuletzt hinzugefügt werden. Die Lösung wurde zwischen zwei in einer Apparatur fixierte Glasplatten gegossen, so dass am oberen Rand noch 2cm für das Sammelgel frei blieben. Diese 2cm wurden anschließend mit Isopropanol gefüllt. Das Gel ließ man dann für 15min bei RT auspolymerisieren. Nach dem Abgießen des Isopropanols wurden die Ingredienzen des Sammelgels (siehe 7.2.3.11) zusammen pipettiert und über das Trenngel gegossen. Zum späteren Auftragen der Proben wurde ein Kamm luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Für 1h ließ man das Sammelgel auspolymerisieren, bevor man es in die dafür vorgesehene Elektrophoresekammer einsetzte. Der 1x SDS-Laufpuffer (siehe 7.2.3.11) wurde in die Kammer eingefüllt, der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Geltaschen mit dem Laufpuffer gespült. Zur Auftrennung der Protein-Proben wurden 5 - 10µg je Probe verwendet. Diese wurden mit H<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt und für 5min bei 95°C (Thermocycler comfort) inkubiert. Anschließend

wurden 4µl 6x SDS-Probenpuffer hinzugegeben und nochmals für 5min bei 95°C denaturiert. Während der Proben-Konzentrierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 40mA und während der Auftrennung im Trenngel eine Spannung von 50mA angelegt, so dass sich die Proteinbanden auftrennten. Nach 60 - 90min, je nachdem wann die Lauffront des Bromphenolblaus das untere Ende des Trenngels erreichte, wurde die Spannung abgestellt. Bei dieser SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) wanderte der SDS-Protein-Komplex im angelegten elektrischen Feld in Richtung des Plus-Pols. Hierbei wurden die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis aufgetrennt. Sie lagerten sich in der porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Stokes-Radius und damit nach ihrem Molekulargewicht ab. Zur Charakterisierung wurde das Gel auf eine Membran geblottet und anschließend zur Fixierung mit Coomasie-Brilliantblau G250 gefärbt.

### 3.3.4 Western Blot

Der Western Blot diente in dieser Arbeit der Untersuchung, ob die mit den adjuvanten Genen transfizierten murinen Tumorzellen das jeweilige Protein exprimieren. Hierzu wurde das im Gel aufgetrennte Protein-Extrakt (siehe 3.3.3) auf eine Nitrocellulosemembran (Millipore, Bedford, MA, USA) geblottet. Anschließend wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper (siehe, wie auch alle anderen Lösungen, 7.2.3.11) detektiert, mit dem ECL-System markiert und durch Fluoreszenzaussendung auf einem Film dargestellt. Zunächst wurde das Proteingel dreimal 5min equilibriert. Parallel dazu wurden pro Proteingel eine Nitrocellulosemembran und 4 Filter in entsprechender Größe zurecht-geschnitten. Die Membran wurde in Methanol geschwenkt, anschließend für 5min in H<sub>2</sub>O inkubiert und zum Schluss für 15min in Transferpuffer gelegt. Die Filter wurden für 15min in Transferpuffer geschwenkt. Der Vorgang des Blottens erfolgte über eine Stunde bei 40V mittels Trans-Blot® SD Apparatur und mit folgendem Aufbau:

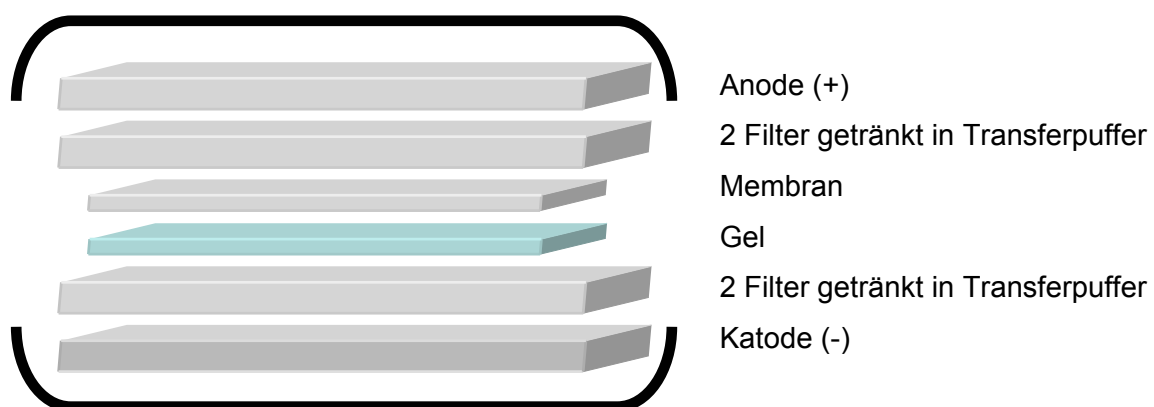


Abb. 3/1: Schematischer Western Blot Aufbau.

Zur Beurteilung des erfolgreichen Protein-Transfers wurde die Membran nach dem Blotvorgang für 5min mit Panceau-Rot angefärbt und der Blotvorgang verifiziert. Anschließend wurde für 10min in H<sub>2</sub>O und für 5min in 1x TBST entfärbt. Mittels Block-Puffer wurden die noch freien Bindungsstellen der Membran geblockt. Dazu wurde die Membran für 1h bei RT oder bei längerer Inkubation bei 4°C in Blockpuffer geschwenkt. Eine Besiedlung mit Keimen bei längerer Blockung wurde mit der Zugabe von Natriumazid verhindert. Nach dem Blocken wurde die Membran nochmals für 30sek mit 1x TBST gewaschen und anschließend die Erst-Antikörperlösung hinzugefügt. Die folgende Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C und leichtem Schwenken auf dem Flachbettschüttler. Am folgenden Tag wurde die Membran viermal für 5min mit 1x TBST gewaschen. Es wurde die Zweit-Antikörperlösung zugegeben und für 2h bei RT inkubiert. Abschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte für je 10min mit 1x TBST und einer für 10min mit 1x TBS. Die nun folgende Detektion der Antikörper-markierten Proteine erfolgte mittels „ECL™Western Blotting Detection-Reagenz“. Es wurde 1ml Lösung pro 70cm<sup>2</sup> Nitrocellulosemembran zugefügt. Die Grundlage der ECL-Detektion ist die Chemieluminiszenz. Hierbei katalysieren unter alkalischen Bedingungen Wasserstoffperoxid sowie die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase die Oxidation von Luminol (zyklisches Diacylhydrazid). Durch diese Oxidation befindet sich das Luminol in einem energiereicheren Zustand und die beim Übergang in den energieärmeren Zustand frei werdende Energie wird als Lichtemission abgegeben und auf einem Film sichtbar gemacht. Je nach Signalstärke erfolgt die Exposition zwischen 2min bis zu 6h. Abschließend wurde der Film (Hyperfilm) entwickelt, gewaschen, fixiert, erneut gewaschen und bei 37°C getrocknet.

### **3.3.5 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen**

Mittels Coomassie-Färbelösung wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine durch Denaturierung im Gel fixiert. Die Nachweisgrenze hierbei lag bei 200 - 400ng Protein je 0,5cm Bande. Zum Färben wurde das Gel 15 - 20min in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in der Entfärbelösung gewaschen bis man die Proteinbanden deutlich vom Hintergrund unterscheiden konnte und anschließend getrocknet.

### **3.3.6 Trocknen von SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur längeren Aufbewahrung Coomassie-gefärbter Gele wurden diese getrocknet. Hierzu wurden sie zuerst in einer „Drying Solution“ für 30min inkubiert und danach luftblasenfrei

zwischen zwei in Wasser eingeweichte Zellophan-Folien platziert. Diese wurden in einen Gel Trocknungsrahmen eingespannt und zum Trocknen auf 4°C gestellt.

### **3.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen**

#### **3.4.1 Kultur der Tumorzelllinien und Milzzellen**

Die Kultur der Tumorzelllinien und Milzzellen erfolgte unter Standardwachstumsbedingungen bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Laminarwerkbank durchgeführt. Die adhärent wachsenden Tumorzelllinien RMA und 2F11 (siehe 7.2.1.2) wurden in sterilen Zellkulturflaschen (25, 75, 125cm<sup>2</sup>) in RPMI-Medium (siehe, wie auch alle anderen Medien, 7.2.2.2) kultiviert. Den transfizierten murinen Tumorzellen (2F11) wurde als Selektionshilfe G418 (RPMI+-Medium) in einer Konzentration von 800µg/ml zugefügt. Alle 2 - 4 Tage wurden die adhärent wachsenden Tumorzelllinien subkultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und für 4 - 10min mit Trypsin (1ml/25cm<sup>2</sup>, 3ml/75cm<sup>2</sup>, 5ml/125cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mechanisch durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche vom Boden gelöst und in ein entsprechendes Volumen Kulturmedium aufgenommen. Etwa 1 - 2ml des Volumens wurden in somit geringerer Dichte in die Kulturgefäße überführt und je nach Größe mit 10 - 50ml frischem Medium aufgefüllt. Die Kultur der RMA-Tumorzelllinie erfolgte in RPMI-Medium, C3-Tumorzellen wurden in RPMI-C3-Medium und 2F11-Tumorzellen in RPMI+-Medium kultiviert. Die semi-adhärent wachsenden Milzzellen wurden nach der 1. Restimulierung in αMEM und nach der 2. Restimulierung in αMEM-Con A oder αMEM-IL-2 kultiviert.

#### **3.4.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen**

Einige Tumorzelllinien wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierzu wurde ein Teil der Zellen bei der Subkultivierung abgenommen und für 3min bei 1.200UPM (Megafuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1,9ml gekühlten Kryokonservierungsmedium resuspendiert. Mit der Zellsuspension gefüllte 2ml Kryokonservierungsröhrchen wurden für 1h auf Eis inkubiert und ü.N. bei -80°C gelagert. Einen Tag oder max. eine Woche später folgte die Überführung der Röhrchen in den flüssigen Stickstoff (-196°C).

### **3.4.3. Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Um murine kryokonservierte Zellen zu rekultivieren, wurden diese aus dem Flüssigstickstoff entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Zum Auswaschen des zelltoxischen, im Einfriermedium enthaltenen DMSO (siehe 7.2.2.2), wurden 10ml RPMI-Medium zugegeben und für 4min bei 1.200UPM (Megafuge) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10ml RPMI-Medium resuspendiert und in eine 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt, der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert.

### **3.4.4 Lebendzellzahlbestimmung**

Zur Zellzahlbestimmung wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Es wurde ein Aliquot der zu zählenden Zellkultur 1: 10 mit Trypanblau verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Da Trypanblau spezifisch tote Zellen anfärbt, musste man darauf achten, die hell leuchtenden lebenden Zellen zu zählen und nicht die mit Trypanblau angefärbten toten Zellen.

### **3.4.5 Transfektion durch METAFECTENE™**

Das polykationische Transfektionsreagenz METAFECTENE liegt in liposomaler Form in Kombination mit einem neutralen Ko-Lipid vor. Aufgrund seiner spezifischen molekularen Struktur wird die zu transfizierende DNA in kompakte Strukturen komplexiert, so dass der Eintritt der DNA hocheffizient stattfinden kann. Zur Transfektion wurden für jedes Konstrukt 12x 10<sup>5</sup> Zellen (RMA) zusammen mit 5ml RPMI-Medium in einer Petrischale ausplattiert. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis eine Konfluenz von ca. 50% erreicht war. Dies bedeutet, dass die Wachstumsfläche zu 80 - 90% bedeckt sein muss. Für jeden Transfektionsansatz wurden nun folgende Lösungen in einer 96-Loch-Platte vorgelegt:

Lösung A: 12µg DNA in 100µl serum/ antibiotikafreies Medium (RPMI)

Lösung B: 25µl METAFECTENE in 100µl serum/ antibiotikafreies Medium (RPMI)

=> Lipid: DNA-Verhältnis von circa 3: 1

Jetzt wurden beide Lösungen vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Zur Ausbildung des DNA-Lipid-Komplexes ließ man die Suspension für 15 - 20min bei RT inkubieren. Nach dieser Zeit wurde der DNA-Lipid-Komplex zu den Zellen in der Petrischale gegeben und der gesamte Transfektionsansatz für 20h bei 37°C, 90%

Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die folgenden 3 - 4 Tage wurde täglich das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen bevor frisches RPMI-Medium zugegeben wurde. Am 4. oder 5. Tag nach Transfektion, je nach Konfluenz, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert (3ml/ Petrischale). Durch leichtes Beklopfen der Petrischale wurden die Zellen mechanisch vom Boden gelöst und in 5ml Kulturmedium (RPMI) aufgenommen. Nun wurden die Zellen für 4min bei 4°C und 1.200UPM (Megafuge) zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zum Waschen wurden 4ml PBS hinzu pipettiert und nochmals unter den gleichen Bedingungen (4min, 4°C, 1.200UPM) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mittels RNA- (siehe 3.2.1) oder Proteinextraktion (siehe 3.3.1) weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert.

### **3.5 Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.5.1 Anästhesie der Versuchstiere**

Für die KT-Applikationen (siehe 3.5.2), die C3-Tumorzell-Applikationen (siehe 3.5.4), die DNA-Immunisierungen (siehe 3.5.3) sowie teilweise bei der Bestimmung der Tumorgößen wurden die Versuchstiere (Mäuse siehe 7.2.1.3) kurz mit Ether betäubt und im Anschluss mit Isofluran narkotisiert. Hierzu wurde Isofluran (2 Volumenprozent) mit Sauerstoff in einem Vaporizer vermischt und den Mäusen direkt über einen Inhalator verabreicht. Die Tiere blieben während des gesamten Immunisierungsvorganges narkotisiert, so dass eine korrekte und bei allen Tieren gleiche Immunisierung in die Wadenmuskulatur erfolgte.

#### **3.5.2 Kardiotoxin-Applikation**

Aufgrund der adjuvanten Wirkung von Kardiotoxin (KT) wurde den narkotisierten Mäusen 5 Tage vor der geplanten DNA-Immunisierung KT appliziert. Hierzu wurden über eine sterile Kanüle jeweils 3µg/50µl KT in beide Wadenmuskeln (Musculus tibialis anterior) injiziert.

#### **3.5.3 DNA-Immunisierungen**

Fünf Tage nach der Vorbehandlung mit KT wurden die DNA-Immunisierungen mit der Plasmid-DNA aus den Maxipräparationen (siehe 3.1.13) verwendet. Die DNA wurde mit 1x PBS je nach Konstrukt eingestellt. Wenn die Tiere allein das pTHamp-E7SH bzw. die Leervektoren appliziert bekamen, wurde die Konzentration der DNA auf 1µg/µl eingestellt. Bei Ko-Applikation des pTHamp-E7SH und eines adjuvanten Gens, wurde die DNA zum besseren Vergleich auf 2µg/µl eingestellt. Die Immunisierung erfolgte an narkotisierten

Mäusen, wobei jeder Maus durch eine sterile Kanüle 50µl der DNA-Lösung beidseits in den Muskulus tibialis anterior injiziert wurde. Somit wurden jedem Tier 50ug DNA pro Muskel (100µg DNA pro Tier) appliziert. Nach 10 Tagen erfolgte nach dem gleichen Schema eine Booster-Immunisierung.

### **3.5.4 Tumor-Regressions-Experimente**

Zur Darstellung eines *in vivo* Effektes der adjuvanten Konstrukte wurden Tumor-Regressions-Experimente mit C3-Tumorzellen (siehe 7.2.1.2) durchgeführt. Diese wurden vor der geplanten Applikation durch Trypsinierung gelöst und zweimal mit PBS gewaschen, um das G418 des Selektionsmediums und das Trypsin auszuwaschen. Nach diesen Waschschritten wurden die Zellen in PBS aufgenommen, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und mittels PBS auf eine Konzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro 100µl PBS eingestellt. Zur Sicherstellung, dass jede Maus die exakte Zellzahl erhält, wurden die Zellen für jede Applikation in ein separates Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und umgehend auf Eis gelagert. Somit wurde das Adhäsionsverhalten der Zellen untereinander und mit der Gefäßwand teilweise unterdrückt. Im Anschluss an die Konzentrationseinstellung erfolgte die Injektion der Tumorzellen. Hierzu wurden die Zellen subkutan in die zuvor rasierte Flanke der Mäuse injiziert. In der Regel waren nach 8 - 12 Tagen Tumoren (1 - 4mm) gewachsen, so dass die erste DNA-Immunisierung erfolgen konnte. Um für jedes Konstrukt im Mittel die gleiche Anfangstumorgroße zu erzielen, wurden die Tiere vor der 1. DNA-Immunisierung in neuen entsprechenden Konstellationen auf die Käfige verteilt. Nach der 1. Immunisierung wurde alle 2 - 3 Tage die Größe der Tumoren bestimmt. Die Booster-DNA-Immunisierungen erfolgten ca. 10 - 12 Tage nach der 1. Immunisierung. Die Messungen der Tumoren wurden fortgeführt bis die Tumoren der Kontrollgruppe eine Größe von 1,5cm überschritten.

## **3.6 Immunologische Methoden**

### **3.6.1 Milzentnahme und Anlegen von Milzzell-Kulturen**

Die Milzentnahme erfolgte 10 Tage nach der Booster-Immunisierung. Hierzu wurden den Versuchstieren unter einer Laminarwerkbank unter sterilen Bedingungen die Milzen entnommen und in gekühltes PBS überführt. Jede Milz wurde einzeln behandelt und zuerst mittels eines Plastikstempels durch ein engmaschiges (0,2mm) Metallgitter (Sieb) gedrückt. Die Milzzellsuspension wurde in ein 15ml Plastik-Röhrchen überführt und für 5min bei 1.200UPM (Megafuge) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 6 - 8ml ACT-Puffer (siehe 7.2.3.8) zur Erythrozyten-Lyse resuspendiert und für

8 - 10min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 5min bei 1.200UPM zentrifugiert und das Pellet in 6ml  $\alpha$ MEM-Medium aufgenommen. Hiervon wurde 1ml für den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay verwendet. Die restlichen 5ml wurden auf zwei Zellkulturen verteilt (je 2,5ml/25cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche). Diese beiden Flaschen wurden mit  $\alpha$ MEM-Medium auf 9ml aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte die 1. Restimulierung mit RMA- und 2F11-Zellen. Danach wurden die Zellen bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in der Luft inkubiert.

### 3.6.2 Inaktivierung der Zellen durch $\gamma$ -Bestrahlung

Die zur Restimulierung eingesetzten Zellen wurden zuvor radioaktiv bestrahlt. Die verabreichte Strahlung inhibiert die Proliferationsfähigkeit der Zellen, so dass sie innerhalb weniger Tage absterben und ein Überwachsen der Milzzell-Kulturen verhindert wird. Die Tumorzellen (RMA und 2F11) wurden mit 100Gy bestrahlt. Die frisch isolierten Milzzellen („Feederzellen“) dienten der Präsentation von ko-stimulatorischen Molekülen (B7.1 und B7.2). Sie wurden vor Zugabe mit 33Gy bestrahlt.

### 3.6.3 *In vitro* Restimulierung von zytotoxischen T-Zellen

Die erste Restimulierung der T-Lymphozyten erfolgte direkt nach dem Anlegen der Milzzell-Kulturen (siehe 3.6.1). Aus jeder Milz wurden 2 Zellkulturen angelegt. Eine zur Restimulierung mit RMA-Zellen und die andere zur Restimulierung mit 2F11-Zellen. Hierzu wurden die RMA- und 2F11-Zellen trypsiniert (siehe 3.4.1) und jeweils 1 - 2x 10<sup>6</sup> Zellen in 1ml  $\alpha$ MEM-Medium aufgenommen und radioaktiv bestrahlt. Anschließend wurde jeweils 1ml in die entsprechende Zellkulturflasche überführt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Milzzell-Kulturen von pTHamp-Leervektor immunisierten Mäusen restimuliert. Alle Kulturflaschen wurden, senkrecht lagernd, bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am gleichen Tag wie die Milzentnahme (Tag 26 nach KT-Applikation) und vor der 1. Restimulierung wurde ein *ex vivo* Elispot-Assay (siehe 3.6.4) durchgeführt. Der 2. Elispot-Assay wurde 5 Tage nach der 1. *in vitro* Restimulierung (Tag 31 nach KT-Applikation) vollzogen. Sieben Tage nach der 1. *in vitro* Restimulierung erfolgte die 2. *in vitro* Restimulierung (Tag 33 nach KT-Applikation). Hierzu wurden die Milzzellen in 24-Loch-Kulturplatten in zunehmender Verdünnung ausplattiert. Jede 25cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurde auf 6 Vertiefungen verteilt. Vor dem Anlegen der Verdünnungsreihen wurden in jede Vertiefung der 24-Loch-Kulturplatte entweder 2ml IL-2 haltiges  $\alpha$ MEM-ConA-Medium oder  $\alpha$ MEM-IL-2-Medium (siehe 7.2.2.2) pipettiert. IL-2 ist ein Proliferationsaktivator für Lymphozyten (Grande et al. 2006). Danach wurden in jede Vertiefung 100 $\mu$ l  $\alpha$ MEM-ConA-Medium mit 2x 10<sup>5</sup> bis 5x 10<sup>6</sup> bestrahlte



Milzzellen („Feederzellen“) hinzugegeben. Die frischen Milzzellen enthalten den kostimulatorischen Faktor B7, welcher zusammen mit IL-2 für die Proliferation der T-Lymphozyten notwendig ist. Die Milzzell-Kulturen, welche bei der 1. *in vitro* Restimulierung RMA- bzw. 2F11-Zellen erhalten hatten, wurden weiterhin wöchentlich mit diesen Zellen ( $1 \times 10^5$ /Vertiefung) restimuliert. Bis zum jeweils folgenden Elispot-Assay 5 Tage nach Restimulierung wurden die 24-Loch-Kulturplatten bei 37°C, 90% Luftfeuchte und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Insgesamt wurden die Milzzell-Kulturen vier- bis fünfmal restimuliert. Der Elispot-Assay wurde jeweils 5 oder 6 Tage nach entsprechender *in vitro* Restimulierung durchgeführt. Nach der 2. oder 3. *in vitro* Restimulierung wurde, je nach mikroskopischem Befund der Zellen, parallel zum Elispot-Assay ein <sup>51</sup>-Chrom-Freisetzungs-Assay (siehe 3.6.5) durchgeführt.

### 3.6.4 Interferon-γ-Elispot-Assay

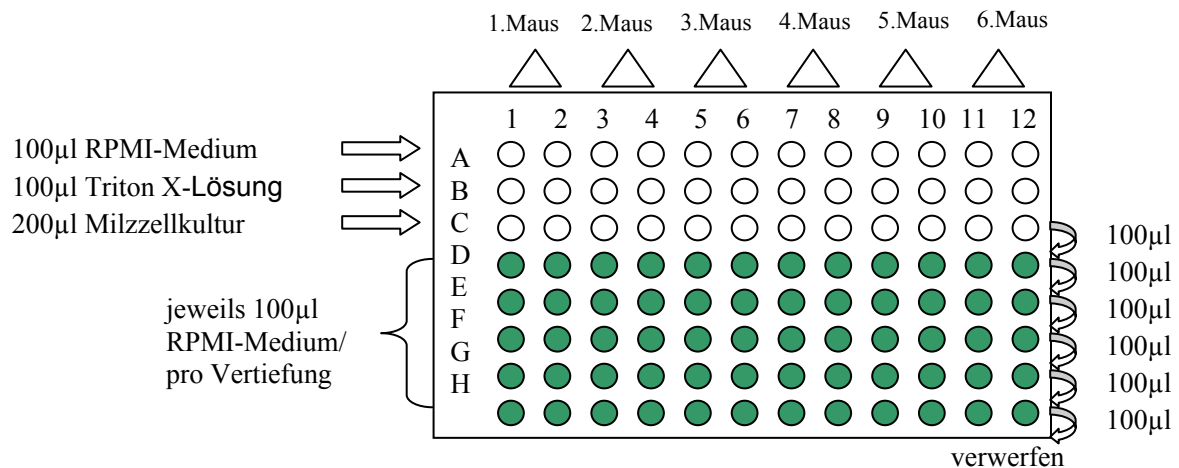
Der Elispot-Assay (Enzym Linked Immuno Spot-Assay) wird zum Nachweis von aktivierten IFN-γ-sezernierenden Zellen durchgeführt. Bei diesem Assay bindet zuerst ein Erst-Antikörper sezerniertes IFN-γ. Anschließend bindet ein biotin-gekoppelter Zweit-Antikörper das durch den Erst-Antikörper fixierte Zytokinmolekül. Durch Zugabe der Peroxidase wird das sezernierte IFN-γ durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Es wird lösliches farbloses Chromogen zu unlöslichem, farbigen Farbstoff umgesetzt. Die IFN-γ-sezernierenden Zellen sind dann als violette Spots zu erkennen. Zur Durchführung des Elispot-Assays wurden 96-Loch-Elispot-Platten verwendet. Diese wurden für 5min bei RT mit 200µl PBS pro Vertiefung vorbehandelt und anschließend mit 150ng anti-Maus IFN-γ-Antikörper pro Vertiefung (AK gelöst in 75µl PBS, siehe 7.2.3.9) ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung dekantiert und die Elispot-Platten dreimal mit je 200µl PBS gewaschen und mit 100µl pro Vertiefung RPMI-Medium geblockt. Die zu testenden Milzzellen einer Kultur wurden mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt (etwa  $4 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen in 200µl RPMI-Medium) und unter einer Laminarwerkbank unter sterilen Bedingungen in die Vertiefungen der Elispot-Platte verteilt. Jede Kultur wurde hierbei in drei Vertiefungen der Reihe A oder E verteilt und dreimal seriell verdünnt. Teilweise wurden die Zellen auch in die Reihen A, C, E und G verteilt und nur einmal seriell verdünnt. Jede Vertiefung wurde nach der Verdünnung auf 200µl RPMI-Medium aufgefüllt. Von den drei Reihen einer Milzzell-Kultur blieb eine senkrechte Reihe als Negativkontrolle unbehandelt. In eine Reihe wurde Pokeweed-Mitogen (200ng/ Vertiefung in 2µl PBS), ein Lektin aus der Pflanze *Phytolacca americana* (Positivkontrolle) pipettiert. In die dritte Reihe wurde das T-Helfer-Epitop HPV16-E7<sub>48-54</sub>-Peptid (20ng/2µl pro Vertiefung) zugegeben und anschließend

die gesamte Elispot-Platte für 16 - 20h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch 5maliges Waschen mit 0,5% PBS-Tween 20, einmaliges Waschen mit H<sub>2</sub>O und einmaliges Waschen mit PBS von den Platten entfernt. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurden die Platten kräftig auf Zellulosepapier ausgeklopft. Anschließend erfolgte ü.N. bei 4°C die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper (150ng Biotin-gekoppelter anti-Maus IFN- $\gamma$ -AK in 75 $\mu$ l PBS/ Vertiefung gelöst). Dieser AK wurde am nächsten Tag durch 4maliges Waschen mit PBS entfernt und die Platte mit Streptavidin-Alkalin-Phosphatase (1: 1000, in 75 $\mu$ l/ Vertiefung) für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem 3maligem Waschen mit PBS erfolgte die Substratreaktion durch Zugabe von 100 $\mu$ l/ Vertiefung BCIP/NBT (siehe 7.2.3.9). Hierzu wurde die Platte nach Zugabe der Entwicklerlösung dunkel gestellt und die Reaktion, sobald deutlich Spots in der Positiv-Kontrolle zu erkennen waren, durch Waschen unter kaltem Leitungswasser abgestoppt. Jeder einzelne entstandene Spot entspricht einer einzelnen IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zelle. Die Quantifizierung der Spots erfolgte mit dem ELISPOT-Reader. In der Auswertung wurde die Anzahl der Spots in der Negativkontrolle von der Anzahl der Spots in der Probe subtrahiert.

### **3.6.5 Bestimmung der spezifischen CTL-Aktivität mittels <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Assay**

Durch einen <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Assay wird die E7-spezifische Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten bestimmt. Jeweils 5 Tage nach der letzten Restimulierung wurden die Milzzell-Kulturen mikroskopisch begutachtet und entschieden, ob ein Chrom-Assay durchgeführt werden sollte. Dies war frühestens nach der 2. aber meist erst nach der 4. Restimulierung der Fall. Als Zielzellen dienten die RMA-Zellen und die 2F11-Zellen. Diese wurden am Tag des Chrom-Assays geerntet (siehe 3.4.1) und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Für die Chromierung wurden zwischen  $2 \times 10^6$  bis zu  $4 \times 10^6$  Zellen verwendet. Diese Zellen wurden in einem Rundbodenröhrchen bei 1.200UPM für 2min (Megafuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Anschließend wurden 5 $\mu$ l Chrom je Ansatz hinzugegeben und die Zellen durch vorsichtiges Wenden leicht aufgerüttelt. In der nun folgenden Inkubation bei 60 - 90min und 37°C wurde das <sup>51</sup>Chrom in das Zytoplasma der Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Zellen dreimal in jeweils 10ml RPMI-Medium gewaschen und für 2min bei 1.200UPM zentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde gründlich dekantiert und das Zellpellet in 1ml RPMI-Medium aufgenommen. Die markierten Zellen wurden jeweils in 19ml RPMI-Medium 1: 20 verdünnt, wodurch sich eine Zelldichte von  $1 \times 10^4$ /ml ergibt. Während der Inkubation der

Zielzellen wurden die 96-Loch-Mikrotiterplatten vorbereitet. Die Milzzellen einer Kultur wurden mittels Zählkammer ausgezählt (etwa  $4 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen in 200µl RPMI-Medium) und für 2min bei 1.200UPM zentrifugiert. Nach dem Dekantieren wurde jedem Pellet 700µl RPMI-Medium zugegeben und resuspendiert. Zusammen mit dem Pellet und dem zurücklaufenden Medium ergab sich ein Volumen von etwa 900µl. Die Zellen wurden anschließend nach folgendem Schema auf die Mikrotiterplatten verteilt.



**Abb. 3/2: Pipettierschema  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay**

Es wurden Platten mit RMA und 2F11 beschriftet, so dass man jede Platte entweder mit RMA-Zellen oder 2F11-Zellen bestücken konnte. Anschließend wurde jede Platte nach folgendem Schema bestückt. In die Reihe A wurden in jede Vertiefung 100µl RPMI-Medium und in die Reihe B in jede Vertiefung 100µl einer 10%igen Triton X-100-Lösung vorgelegt. Jeweils 100µl RPMI-Medium wurden in die Reihen D-H pipettiert. In die Reihe C wurden von jeder Milzzell-Kultur zwei Vertiefungen je RMA und 2F11-Platte mit je 200µl Zellsuspension bestückt. Von jeder Kultur wurde in vertikaler Richtung eine serielle Verdünnung pipettiert, indem von Reihe C ausgehend, jeweils 100µl in die nächste Vertiefung überführt wurden (siehe Abb. 3/2). Zwischen den einzelnen Verdünnungsschritten wurden die Proben durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gründlich gemischt. Die aus Reihe H verbleibenden 100µl wurden verworfen. Im nächsten Schritt wurden die radioaktiv markierten und gewaschenen Zielzellen (RMA, 2F11) in vertikaler Richtung pipettiert. Hierbei wurden 100µl der Zielzell-Suspension ( $10^4$ -Zellen) in jede Vertiefung überführt, wobei jeweils eine der zwei Vertiefungen pro Milzzell-Kultur frei blieb. Die Kulturen wurden schließlich für 4h bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellzahlen der Milzzell-Kulturen mittels Zählkammer bestimmt. Nach 4h wurden, zur Ermittlung der aus den Zielzellen durch Lyse ausgetretenen Radioaktivität, von jeder Vertiefung 50µl Überstand vorsichtig abgenommen und im gleichen Schema auf 96-Loch-Szintillationsplatten überführt.

Die Platten wurden ü.N. bei RT getrocknet und am nächsten Tag in Alufolie eingepackt und bei RT gelagert oder gleich ausgewertet. Zur Auswertung wurden in jede Vertiefung 150µl Auszähllösung hinzugegeben und jede Platte einzeln im Szintillationszähler ausgezählt. Die Menge der aus den Zielzellen ausgetretenen Radioaktivität korreliert dabei direkt mit dem Ausmaß der Lyse, welche durch die Effektorzellen der Milzzell-Kulturen verursacht wird. Für jede einzelne Vertiefung lässt sich die spezifische Lyse nach folgender Formel berechnen:

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{\text{Aktivität in Probe (cpm)} - \text{Aktivität bei Spontanlyse (cpm)} \times 100\%}{\text{Aktivität bei totaler Lyse (cpm)} - \text{Aktivität bei Spontanlyse (cpm)}}$$

### **3.7 Statistische Auswertung der Tumor-Regressions-Experimente**

Die Tumorgröße innerhalb einer Immunisierungs-Gruppe wurde als arithmetisches Mittel angegeben und die Streuung als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, Standard Error of Mean) dargestellt.

Mittels des zweiseitigen t-Tests nach Student für unabhängige Stichproben wurden die Ergebnisse auf Signifikanz geprüft. Eine Wahrscheinlichkeit mit  $p < 0,5$  wurde als signifikant definiert,  $p < 0,01$  bezeichnet ein hoch signifikantes Ergebnis. Als Tendenz wurde eine Wahrscheinlichkeit mit  $p < 0,1$  angegeben. Sämtliche Berechnungen wurden mit der Analysefunktion von Microsoft EXCEL© erstellt.

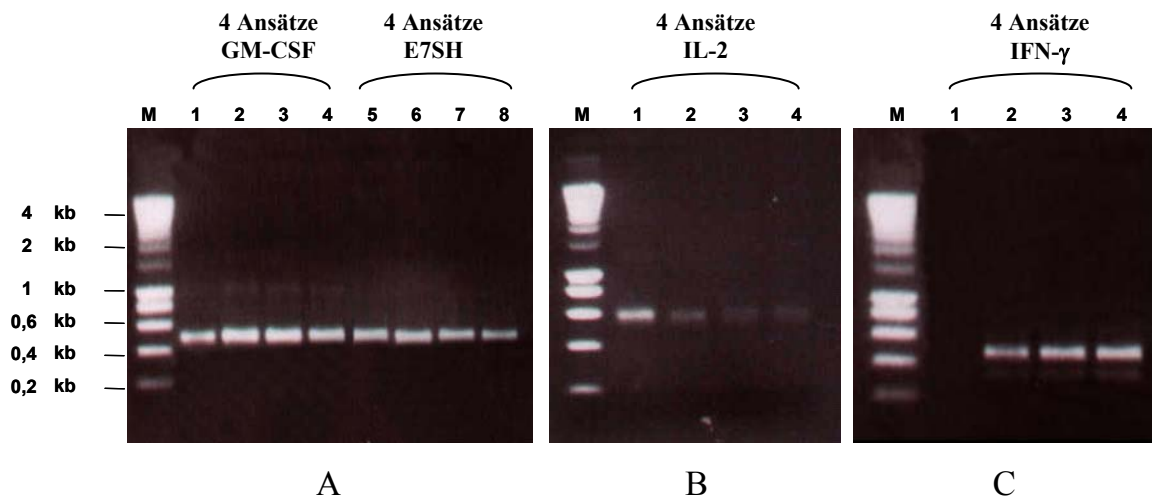
## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Generierung der Immunisierungsvektoren pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ sowie pTHamp-IL-2**

Die adjuvanten Gene GM-CSF, IL-2 und IFN- $\gamma$  wurden jeweils in den Expressionsvektor pTHamp eingefügt.

#### **4.1.1 Amplifizierung der adjuvanten Gen-Konstrukte**

Als Ausgangs-DNA für die Amplifizierung der adjuvanten Gen-Konstrukte dienten pVAC5-GM-CSF (Prof. Robert Hawkins, Cancer Research, Manchester, UK), pNGVL-3-IL-2 (NIH), und pHBAPr-3P-neo-IFN- $\gamma$  (Dr. Howard A. Young, Center for Cancer Research, NIH). Die verschiedenen adjuvanten Gene wurden mittels chemischer Transformation in chemisch-kompetente *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) Bakterien transformiert. Die auf Agar-Platten gewachsenen Ampizillin-resistenten Klone wurden für die Plasmid-Minipräparation (siehe 3.1.12) verwendet. Zur Herstellung einer ausreichenden Menge DNA wurde eine Plasmid-Maxipräparation (siehe 3.1.13) durchgeführt. Anschließend wurden mittels PCR (siehe 3.1.14 und 3.1.15) über Primer in jedes der Konstrukte Schnittstellen eingefügt. Über den 5'-Primer wurden die Kozak-Sequenz (siehe 7.1) sowie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme 5'-Not I, BamH I, Sma I und Hind III -3' eingefügt. Am 3'-Ende wurden die Sequenzen für die Schnittstellen 5'-Pst I, Xba I, Xho I und EcoR I -3' angefügt. Die PCR wurde im analytischen Agarosegel überprüft (siehe Abb. 4/1). Um die Salze des PCR-Puffers sowie die DNA-Polymerase zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Daraufhin erfolgte der präparative Verdau der aufgereinigten DNA (siehe 3.1.1 und 4.1.3).



**Abb. 4/1: Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Gene GM-CSF, E7SH, IL-2 und IFN- $\gamma$ .** (M) in A, B und C Smart-Ladder (500ng) als Molekulargewichtsmarker (MGM). **A:** Spur (1) bis (4) zeigt 4 verschiedene PCR Ansätze von GM-CSF, alle sind positiv für GM-CSF (430bp); Spur (5) bis (8) zeigt 4 verschiedene PCR-Ansätze des E7SH, alle 4 sind positiv für E7SH (450bp); **B:** zeigt 4 verschiedene PCR-Ansätze von IL-2, alle sind positiv für IL-2 (517bp); **C** zeigt 4 verschiedene PCR-Ansätze von IFN- $\gamma$ , die Ansätze (2), (3) und (4) sind positiv für IFN- $\gamma$  (475bp).

#### 4.1.2 Linearisierung des Expressionsvektors pTHamp

Der Vektor pTHamp wurde freundlicherweise von Herrn Thomas Hanke, Oxford, UK, zur Verfügung gestellt. Um diesen Vektor zu amplifizieren, wurde er mittels Elektroporation (siehe 3.1.10) in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und vervielfältigt. Die Linearisierung des Vektors erfolgte über Nacht durch einen enzymatischen Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe 4.1.3). Anschließend wurde der gesamte Ansatz in einem präparativen Agarosegel (siehe 3.1.2) aufgetrennt, die entsprechende Bande isoliert und mit einem Gel-Extraktions-Kit (3.1.3) die Vektor-DNA aufgereinigt. Um eine Vektor-Religation zu verhindern, wurde die DNA an den 5'-Enden dephosphoryliert (siehe 3.1.5). Zur Aufreinigung der DNA wurde im Anschluss eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 3.1.7) durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte die 5'-Dephosphorylierung direkt im Anschluss an den präparativen Verdau. Die Quantifizierung der DNA fand mit Hilfe eines analytischen Agarosegels und spektrophotometrisch (siehe 3.1.4) statt.

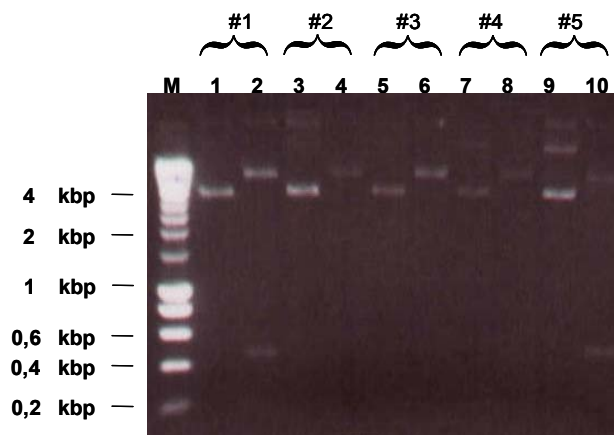
#### 4.1.3 Präparativer Verdau der adjuvanten Gen-Konstrukte sowie des pTHamp-Vektors

Um für eine Ligation eingesetzt werden zu können, müssen für das adjuvante Gen sowie für den pTHamp-Vektor die gleichen Restriktionsenzyme verwendet werden. Die Gene GM-CSF und IFN- $\gamma$  wurden mittels Hind III und Xba I, das IL-2-Gen über Bam HI und Xba I in den

Vektor eingefügt. Der präparative Verdau wurde über Nacht durchgeführt. Nach der Gel-Extraktion aus dem präparativen Agarosegel wurden die adjuvanten Gene sowie der Vektor mit Hilfe eines analytischen Agarosegels sowie spektrophotometrisch quantifiziert.

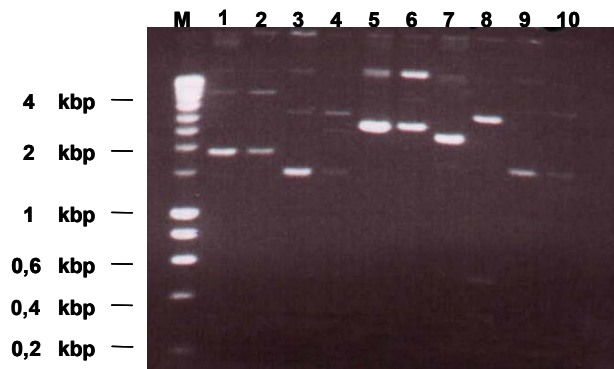
#### **4.1.4 Ligation des pTHamp-Vektors mit den adjuvanten Genen GM-CSF, IFN- $\gamma$ oder IL-2**

Der linearisierte und 5'-dephosphorylierte Vektor pTHamp wurde jeweils mit GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 ligiert (siehe 3.1.6). Nach mindestens einer Stunde bei 22°C oder am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz in chemisch-kompetente *E. coli* Bakterienzellen vom Typ DH5 $\alpha$  transformiert (siehe 3.1.11). Für die Plasmid-Minipräparation (siehe 3.1.12) wurden mehrere der auf den Agar-Platten gewachsenen Ampizillin-resistenten Klone eingesetzt. Über einen Hind III/ Xba I -(GM-CSF und IFN- $\gamma$ ) bzw. einen Bam HI/ Xba I-Verdau (IL-2) wurden die Klone im analytischen Agarosegel (siehe 3.1.2) untersucht (siehe Abb. 4/2). Für die Sequenzierung der Konstrukte wurde DNA aus der Plasmid-Minipräparation eingesetzt. Unter Verwendung der Primer pTHamp-Forward und pTHamp-Reward (siehe 7.2.3.2) wurden von der Firma Geneart GmbH in Regensburg sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärts-Strang sequenziert. Bei der Sequenz-Kontrolle wurden keine Unterschiede zur erwarteten Sequenz (siehe 7.1) festgestellt.



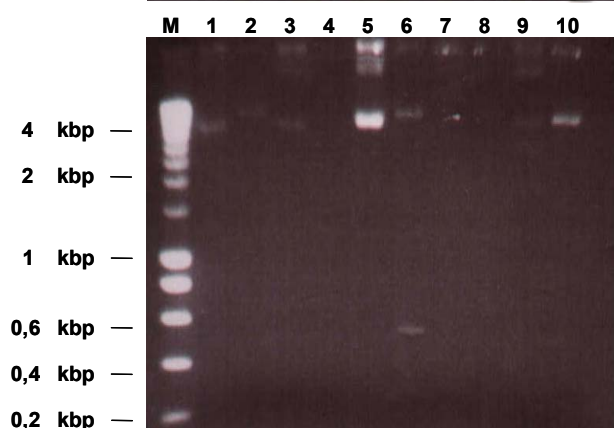
A

Abb. A: 5 Klone GM-CSF  
(1), (3), (5), (7) und (9) unverdaute  
Ansätze  
(2), (4), (6), (8) und (10) mit  
Restriktionsenzymen verdaute  
Ansätze,  
Klon #1 und Klon #5 zeigen das  
ausgeschnittene GM-CSF Insert  
(458bp).



B

Abb. B: 5 Klone IFN- $\gamma$   
(1), (3), (5), (7) und (9) unverdaute  
Ansätze  
(2), (4), (6), (8) und (10) mit  
Restriktionsenzymen verdaute  
Ansätze,  
Klon #4 zeigt das ausgeschnittene  
IFN- $\gamma$  Insert (503bp).



C

Abb. C: 5 Klone IL-2  
(1), (3), (5), (7) und (9) unverdaute  
Ansätze  
(2), (4), (6), (8) und (10) mit  
Restriktionsenzymen verdaute  
Ansätze,  
Klon #3 zeigt das ausgeschnittene  
IL-2 Insert (570bp).

Abb. 4/2: Analytische Agarosegele des analytischen Restriktionsverdaus nach der Ligation zwischen pTHamp und den adjuvanten Genen GM-CSF (A), IFN- $\gamma$  (B) und IL-2 (C), (M) in A, B und C stellt den Smart-Ladder (500 ng) als MGM dar. Bei GM-CSF wurde der Klon #1 bei IFN- $\gamma$  der Klon #4 und bei IL-2 der Klon #3 zur Sequenzierung eingesetzt.

## 4.2 Generierung der Immunisierungsvektoren CpG50-HPV16-E7SH sowie CpG16-HPV16-E7SH

Zum Vergleich der Immunisierungsvektoren pTHamp, CpG50 und CpG16, wurde das E7SH-Gen aus dem pTHamp-Vektor (freundlicherweise von Prof. Öhlschlager zur Verfügung gestellt) in die CpG-Vektoren überführt.



#### 4.2.1 Amplifizierung des E7SH-Gens

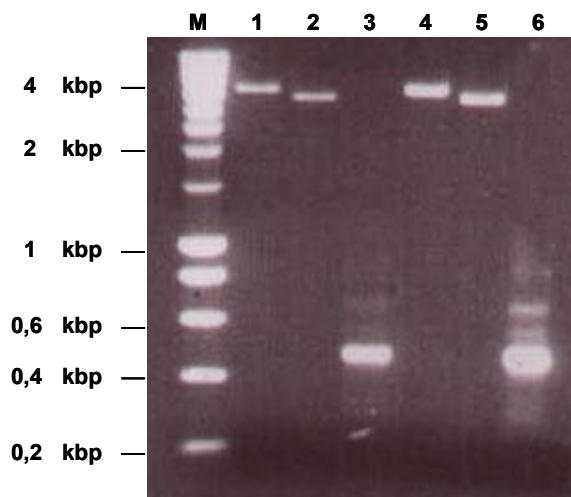
Das Konstrukt pTHamp-HPV16-E7SH wurde zur Amplifizierung des E7SH-Gens benutzt. Hierzu wurde eine PCR mit entsprechenden Primern durchgeführt und das Amplifikat mittels Kit aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA wurde für den präparativen Verdau verwendet.

#### 4.2.2 Amplifizierung der CpG50- und CpG16-Vektoren

Die CpG50 und CpG16-Vektoren (freundlicherweise von Coleypharma, Kanada, erhalten) wurden mittels chemischer Transformation (siehe 3.1.11) in chemisch-kompetente E. coli Bakterien (DH5 $\alpha$ ) eingebracht. Die auf den Agar-Platten gewachsenen Kanamycin-resistenten Klone wurden anschließend für die Plasmid-Minipräparation (siehe 3.1.12) verwendet. Mittels einer Plasmid-Maxipräparation (siehe 3.1.13) wurde die DNA amplifiziert und für den präparativen Verdau eingesetzt.

#### 4.2.3 Präparativer Verdau des HPV16-E7SH-Gens und der CpG-Vektoren

Im präparativen Verdau (siehe 3.1.1) wurden für das E7SH-Gen sowie für die CpG-Vektoren die Restriktionsenzyme Not I und Kpn I eingesetzt. Nach dem über Nacht durchgeführten Verdau wurde die geschnittene DNA mittels Gel-Extraktion aus dem präparativen Agarosegel (siehe 3.1.3) extrahiert. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe eines analytischen Agarosegels (siehe Abb. 4/3) sowie spektrophotometrisch quantifiziert.

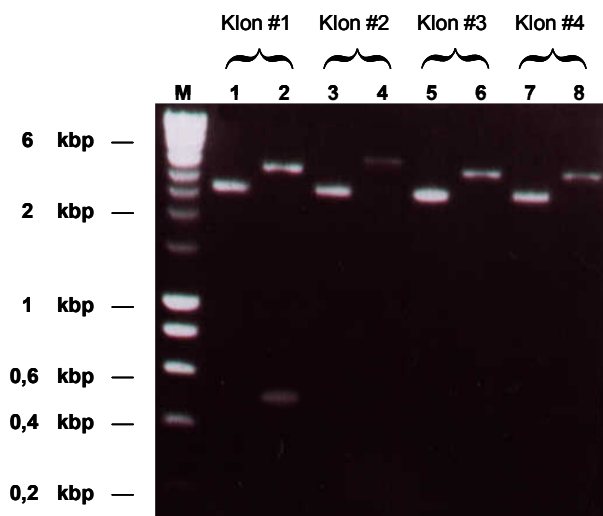


**Abb. 4/3: Gelelektrophoretische Auftrennung der CpG-Vektoren und des E7SH-Gens.**

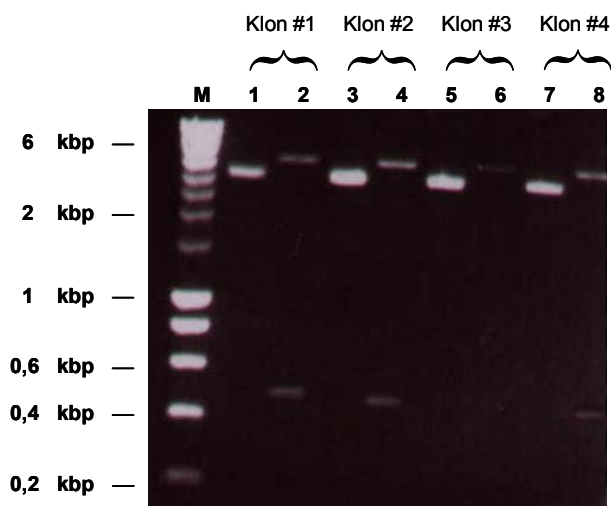
(1) und (4) Not I und Kpn I verdauter und aufgereinigter CpG50-Vektor (3955bp). (2) und (5) Not I und Kpn I verdauter und aufgereinigter CpG16-Vektor (3557bp). (3) und (6) Not I und Kpn I verdautes und aufgereinigtes E7SH-Gen. (M) Smart-Ladder (500ng) als MGM.

#### 4.2.4 Ligation der CpG-Vektoren mit dem HPV16-E7SH-Gen

Die linearisierten und 5'-dephosphorylierten Vektoren CpG50 und CpG16 wurden jeweils mit dem E7SH-Gen ligiert (siehe 3.1.6). Nach mindestens einer Stunde bei 22°C oder am nächsten Tag wurde der Ligationsansatz in chemisch-kompetente *E. coli* Bakterienzellen vom Typ DH5 $\alpha$  transformiert (siehe 3.1.11). Für die Plasmid-Minipräparation (siehe 3.1.12) wurden mehrere der auf den Agar-Platten gewachsenen kanamycin-resistenten Klone eingesetzt. Nach einem Not I/ Kpn I Verdau wurden die Klone mittels analytischer Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.2) auf die richtige Insert-Länge hin untersucht (siehe Abb. 4/4 und 4/5). Für die Sequenzierung der Konstrukte wurde DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (siehe 3.1.12) eingesetzt. Die Firma GeneArt GmbH (Regensburg) generierte die Sequenzier-Primer und führte die Sequenzierung der Konstrukte CpG50-HPV16-E7SH und CpG16-HPV16-E7SH durch. Es wurden sowohl der Vorwärts- als auch der Rückwärts-Strang sequenziert. Bei der Kontrolle der Sequenzen wurden keine Differenzen zur erwarteten Sequenz festgestellt. Im Anhang sind die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte dargestellt (siehe 7.1).



**Abb. 4/4 Analytisches Agarosegel** nach Restriktionsverdau mit Not I/ Kpn I nach der Ligation zwischen **CpG16- und dem E7SH-Gen**. (M) Smart-Ladder (500ng) als MGM, (1), (3), (5) und (7) unverdaute DNA der einzelnen Klone; (2), (4), (6) und (8) analytisch verdaute DNA, **Klon #1** zeigt das ausgeschnittene E7SH-Insert (483bp). Dieser Klon wurde zur Sequenzierung eingesetzt.



**Abb. 4/5 Analytisches Agarosegel** nach Restriktionsverdau mit Not I/ Kpn I nach der Ligation zwischen **CpG50 und dem E7SH**. (M) Smart-Ladder (500ng) als MGM, (1), (3), (5) und (7) unverdaute DNA der einzelnen Klone; (2), (4), (6) und (8) analytisch verdaute DNA. Die Klone #1, #2 und #4 zeigen das ausgeschnittene E7SH-Insert (483bp), Es wurde der **Klon #2** zur Sequenzierung eingesetzt.

### 4.3 Transkriptionsnachweis der hergestellten Konstrukte

#### 4.3.1 Transfektion von pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ und pTHamp-IL-2 in RMA-Zellen

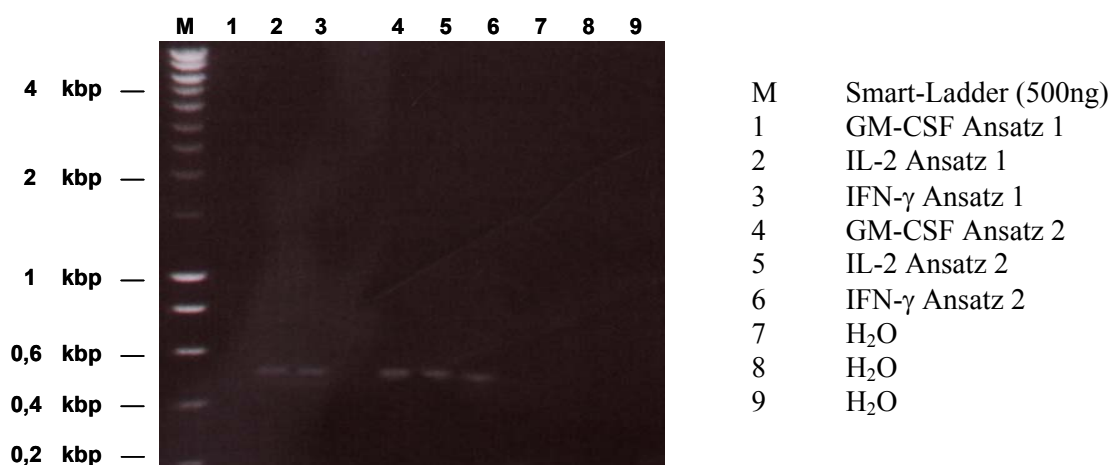
Zum Nachweis der Transkription bzw. Expression der adjuvanten Gene wurden diese mittels Transfektionsreagenz METAFECTENE<sup>®</sup> in RMA-Zellen transfiziert (siehe 3.4.5). Für den Western Blot wurde anschließend eine Gesamt-Protein-Extraktion (siehe 3.3.1) durchgeführt. Mittels einer RNA-Extraktion (siehe 3.2.1) wurde die mRNA aus den RMA-Zellen isoliert und für die RT-PCR und den Northern Blot verwendet.

#### 4.3.2 Transkriptionsnachweis mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Nach der mRNA-Isolierung wurde diese zur Synthese des komplementären cDNA-Stranges in einer RT-PCR eingesetzt. Anschließend diente die cDNA als Matrize in einer PCR.

##### 4.3.2.1 Kontrolle der cDNA-Synthese durch Amplifikation von GAPDH

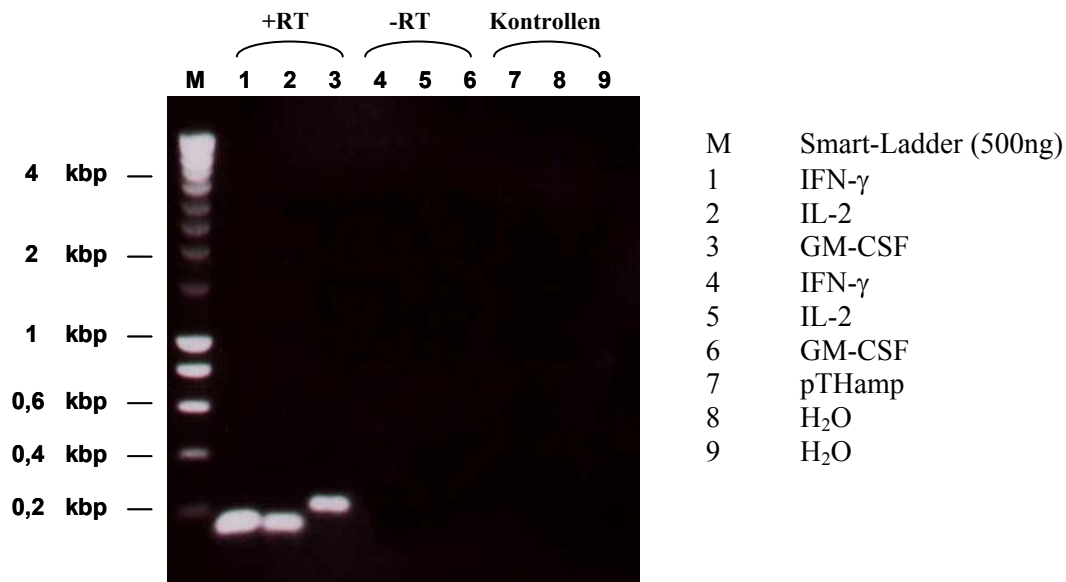
Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde der Nachweis von GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) (Primer siehe 7.2.3.2) mittels PCR (siehe 3.1.16) durchgeführt. Die Produkte der PCR wurden in einem analytischen Agarosegel (siehe 3.1.2) aufgetrennt und anschließend analysiert. Die cDNA-Ansätze von GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 waren GAPDH-positiv (500bp) (siehe Abb. 4/6). Von jedem Ansatz wurden 2 verschiedene RT-PCRs durchgeführt (siehe Abb. 4/7, Ansatz 1 bzw. 2). Als Negativkontrolle wurde anstatt cDNA H<sub>2</sub>O verwendet. In der Negativkontrolle konnte keine GAPDH-Expression detektiert werden.



**Abb. 4/6 A: Analytisches Gel nach GAPDH-Amplifikation (500bp) zur Kontrolle der cDNA-Synthese der adjuvanten Gene GM-CSF, IL-2, IFN- $\gamma$ :** GM-CSF: Spur (4) positiv für GADPH, IL-2: Spur (2) und (5) positiv für GADPH, IFN- $\gamma$ : Spur (3) und (6) positiv für GADPH, Spur (7), (8) und (9) Negativkontrolle H<sub>2</sub>O.

#### 4.3.2.2 Nachweis der Transkription von pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$ und pTHamp-IL-2

Zum Transkriptionsnachweis wurden die synthetisierten cDNAs als Matrizen in einer PCR eingesetzt. Hierzu wurde für jedes Konstrukt ein Primerpaar entwickelt und von der Firma Thermo Electron GmbH Ulm hergestellt (siehe 7.2.3.2). Durch das Primerdesign wurden die Längen der PCR-Produkte determiniert: GM-CSF: 220 bp, IL-2: 156 bp, IFN- $\gamma$ : 160 bp (siehe Abb 4/7). Als Kontrolle wurde eine PCR mit den Ansätzen durchgeführt, welche keiner RT-PCR unterzogen wurden. Als weitere Negativkontrolle dienten pTHamp (Leervektor) bzw. H<sub>2</sub>O (siehe Abb. 4/7). Man erkennt für jedes adjuvante Gen die erwarteten Bandengrößen. In den Spuren (4) bis (6) wurde RNA eingesetzt, welche keiner RT-PCR unterzogen wurde. Mit dieser Kontrolle kann man sichergehen, dass die RT-PCR funktioniert hat und nicht ein nach der RNA-Extraktion zurückgebliebener DNA-Rest zu einer Bande geführt hat.



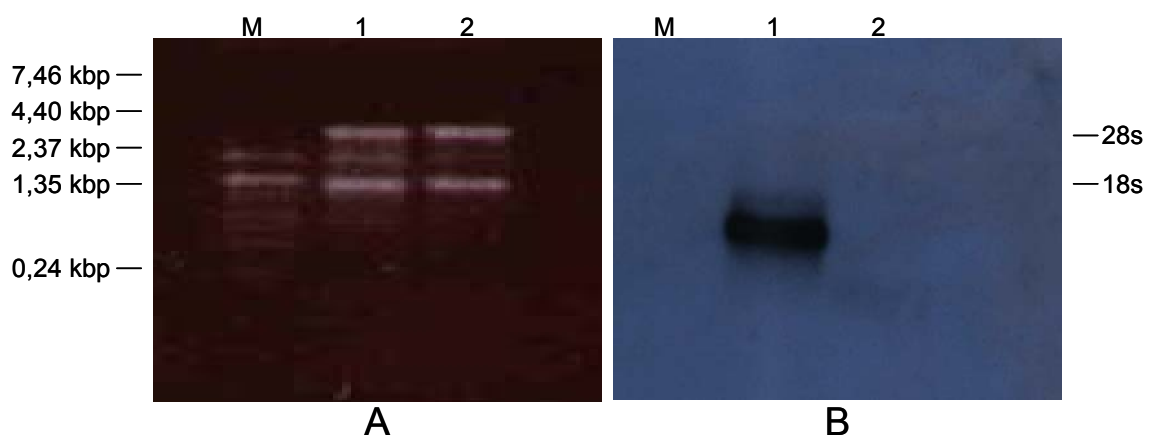
**Abb. 4/7: Transkriptionsnachweis der adjuvanten Gene GM-CSF, IL-2, IFN- $\gamma$ , nach Amplifikation mit spezifischen Primern** (1) IFN- $\gamma$  mit RT-PCR zeigt erwartetes Fragment bei 160bp, Spur (4) IFN- $\gamma$  ohne RT-PCR keine Bande; (2) IL-2 mit RT-PCR zeigt erwartetes Fragment bei 156bp, Spur (5) IL-2 ohne RT-PCR keine Bande; (3) GM-CSF mit RT-PCR zeigt erwartetes Fragment bei 220bp, Spur (6) GM-CSF ohne RT-PCR keine Bande; die Negativproben (7) pTHamp (8) und (9) H<sub>2</sub>O zeigen keine Bande.

#### 4.3.3 Nachweis der GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2-Transkription auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot

Um die Transkription der adjuvanten Gene (GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2) auf mRNA-Ebene zu erfassen, wurde die aus den RMA-Zellen extrahierte Gesamt-RNA in einem 1%igem Agarosegel (in 1x MOPS) elektrophoretisch aufgetrennt (siehe A in Abb. 4/8, 4/9 und 4/10).

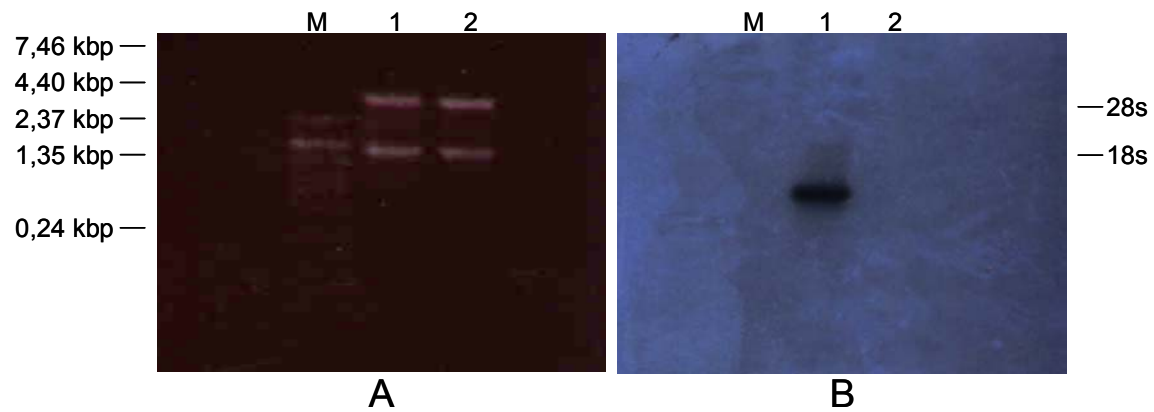
Im Anschluss wurde die aufgetrennte RNA jedes einzelnen Konstruktes auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert und mit einer entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert (siehe 3.2.3.). Der Nachweis der markierten GM-CSF-, IFN- $\gamma$ - und IL-2-Sonden (siehe B in Abb. 4/8, 4/9 und 4/10) erfolgte mittels Röntgenfilmkassette.

Zum Nachweis der GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 Transkription wurden die auf einer Membran fixierten RNAs mit einer radioaktiv markierten GM-CSF- (bzw. IFN- $\gamma$ , IL-2) DNA-Sonde hybridisiert. Nach einer unterschiedlichen Expositionszeit zwischen 24 Stunden bei GM-CSF, 72 Stunden bei IFN- $\gamma$  und 48 Stunden bei IL-2 konnte in allen Ansätzen das entsprechende Transkript mit der richtigen Basenpaarlänge nachgewiesen werden. Für GM-CSF stellte sich ein Transkript bei 458bp, für IFN- $\gamma$  bei 503bp und für IL-2 bei 557bp dar. Als Negativkontrolle diente in allen Fällen RNA von pTHamp-Leervektor-transfizierten RMA-Tumorzellen, die nach der Hybridisierung mit der jeweiligen spezifischen Sonde kein Transkript zeigten (siehe B Spur (2) in Abb. 4/8, 4/9 und 4/10). In der Abbildung 4/8 sind in A jeweils die elektrophoretisch aufgetrennten RNAs und in B die nach der Hybridisierung entwickelten Röntgenfilme dargestellt. Als Marker (M) wurde bei allen Northern Blots ein RNA-Leiter eingesetzt. Die RNA stellt sich im im Ethidiumbromid gefärbten Gel als 28s- und 18s-RNA (Svedberg-Einheit) dar.



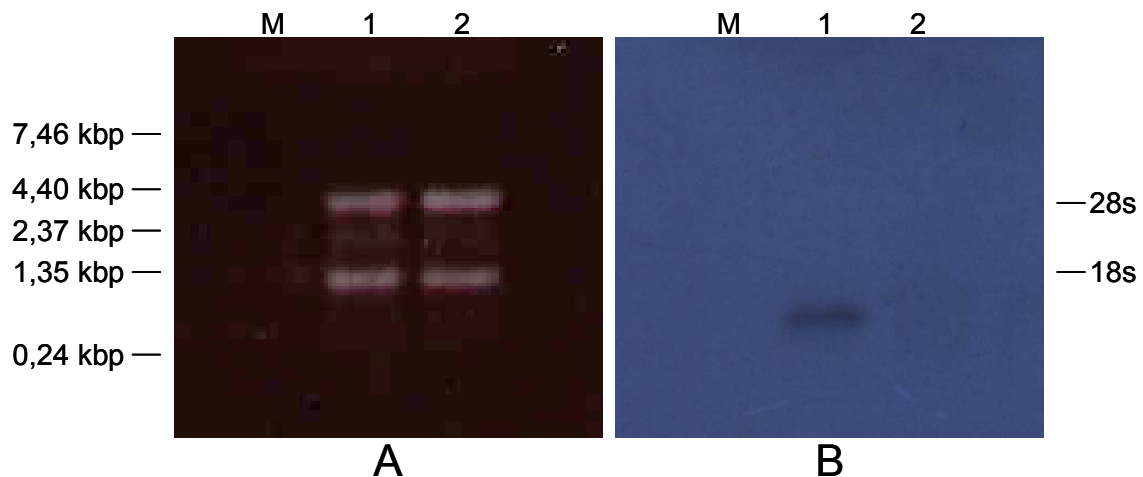
**Abb. 4/8: GM-CSF Transkriptionsnachweis in RMA-Tumorzellen**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA; (M) RNA-Leiter, (1) GM-CSF-RNA, (2) RNA von pTHamp-transfizierten RMA-Tumorzellen als Negativkontrolle (B) Nachweis der radioaktiv markierten GM-CSF-DNA-Sonde (Spur (1) 458bp), nach Hybridisierung mit RNA mittels Röntgenfilmkassette (Expositionszeit 24 Stunden).



**Abb. 4/9: IFN- $\gamma$  Transkriptionsnachweis in RMA-Tumorzellen**

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA; (M) RNA-Leiter, (1) IFN- $\gamma$ -RNA, (2) RNA von mit pTHamp-transfizierten RMA-Tumorzellen als Negativkontrolle (B) Nachweis der radioaktiv markierten IFN- $\gamma$ -DNA-Sonde (Spur (1) 503bp), nach Hybridisierung mit RNA mittels Röntgenfilmkassette (Expositionszeit 72 Stunden).



**Abb. 4/10: IL-2 Transkriptionsnachweis in RMA-Tumorzellen**

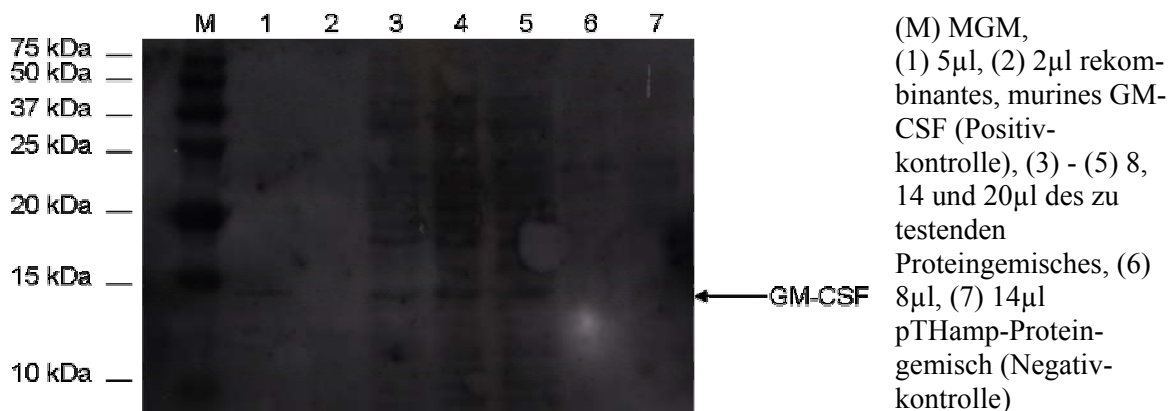
(A) Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA; (M) RNA-Leiter, (1) IL-2-RNA, (2) RNA von pTHamp-transfizierten RMA-Tumorzellen als Negativkontrolle (B) Nachweis der radioaktiv markierten IL-2-DNA-Sonde (Spur (1) 557bp), nach Hybridisierung mit RNA mittels Röntgenfilmkassette (Expositionszeit 48 Stunden).

#### 4.3.4 Nachweis der Proteinexpression von GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2 mittels Western Blot-Analyse

Um die Proteinexpression von den mit den adjuvanten Genen (GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2) transfizierten murinen RMA-Zellen (siehe 3.4.5) nachzuweisen, wurden Gesamt-Protein-Extraktionen (siehe 3.3.1) durchgeführt. Mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Proteingemische aufgetrennt und anschließend im Western Blot (siehe 3.3.4) analysiert.

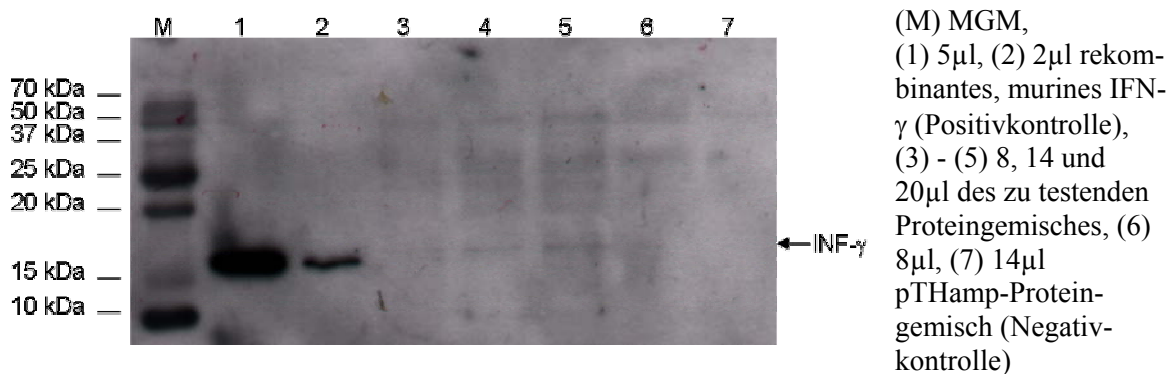
Für jedes der Konstrukte wurde ein einzelner Western Blot durchgeführt. Als Positivproben wurden die murinen rekombinant hergestellten Proteine GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 (siehe

7.2.3.11) verwendet. Diese wurden jeweils in den Spuren (1) und (2) in 2 verschiedenen Konzentrationen (2 und 5µl) aufgetragen. Als Negativkontrolle wurde ein Proteingemisch eingesetzt, welches aus mit dem Leervektor pTHamp-transfizierten murinen RMA-Zellen gewonnen wurde. In den Spuren (6) und (7) wird diese Kontrolle in 2 unterschiedlichen Konzentrationen (8 und 14µl) dargestellt. Die Spuren (3) bis (5) zeigen 3 verschiedene Konzentrationen (8, 14 und 20µl) des jeweiligen das adjuvante Gen enthaltenden Proteingemisches. Die Abbildungen 4/11 (GM-CSF), 4/12 (IFN-γ) und 4/13 (IL-2) zeigen die Ergebnisse des Western Blots für jedes einzelne der adjuvanten Genkonstrukte. Als Molekulargewichtsmarker (M) wurde in allen Western-Blots der Dual-Color-Precision-Plus eingesetzt.



**Abb. 4/11: Western Blot Analyse des GM-CSF**

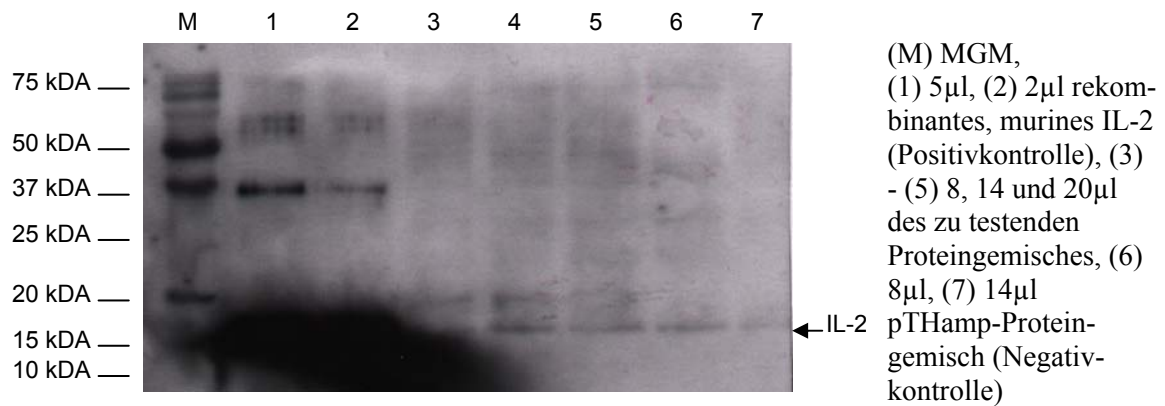
In den Spuren (3) - (5) erkennt man die gleiche Bande wie in der Positivkontrolle (1) auf einer Höhe von ca. 14,2kDa. In (6) und (7) ist diese Bande nicht zu detektieren.



**Abb. 4/12: Western Blot Analyse des IFN-γ**

In den Spuren (3) - (5) erkennt man die gleiche Bande wie in den Positivkontrollen (1) und (2) auf einer Höhe von ca. 15,6kDa. In der Negativkontrolle (6) ist diese Bande jedoch auch zu detektieren.





**Abb. 4/13: Western Blot Analyse des IL-2**

In den Spuren (3) - (5) erkennt man die gleiche Bande wie in den Positivkontrollen (1) und (2) auf einer Höhe von ca. 17,2kDA. In den Spuren (6) und (7) ist diese Bande jedoch auch zu detektieren.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des Western Blots bei dem Konstrukt GM-CSF die Ergebnisse des Northern Blots und der RT-PCR bestätigen. Bei den Konstrukten IFN- $\gamma$  und IL-2 lässt sich jedoch durch den Western Blot keine Expression der Proteine nachweisen, denn in den Negativkontrollen erkennt man ebenfalls schwache Proteinbanden auf der richtigen Höhe (siehe Abb. 4/12 und 4/13). Die Expression dieser beiden Konstrukte konnte somit nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der positiven RT-PCR und des positiven Northern Blots wurden alle drei adjuvanten Gene in Immunisierungsexperimenten (siehe 4.4.4) und Tumor-Regressions-Experimenten (siehe 4.5.1) eingesetzt.

## 4.4 DNA-Immunisierung und Quantifizierung der induzierten Immunantwort mittels Elispot-Assay und Zytotoxizitätsassay

### 4.4.1 Immunisierung der Versuchstiere

In allen Experimenten wurden die Versuchstiere zweimal im Abstand von 10 bis 12 Tagen mit den verschiedenen Immunisierungsvektoren vakziniert (siehe 3.5.3). In einem Tierexperiment, in dem die Tiere vor der eigentlichen DNA-Immunisierung kein Kardiotoxin appliziert bekamen, konnte keine positive Immunantwort detektiert werden (siehe 4.4.3). Es wurde daraufhin in allen Immunisierungsexperimenten dieser Arbeit das DNA-Adjuvants Kardiotoxin eingesetzt. Eine Versuchstiergruppe, welche die gleiche DNA appliziert bekam, bestand aus 3 bis 6 Mäusen. Diese Gruppeneinteilungen sind im jeweiligen Experiment aufgelistet. Als Negativkontrolle diente jeweils eine Gruppe von 3 bis 6 Tieren, denen der Leervektor pTHamp injiziert wurde.



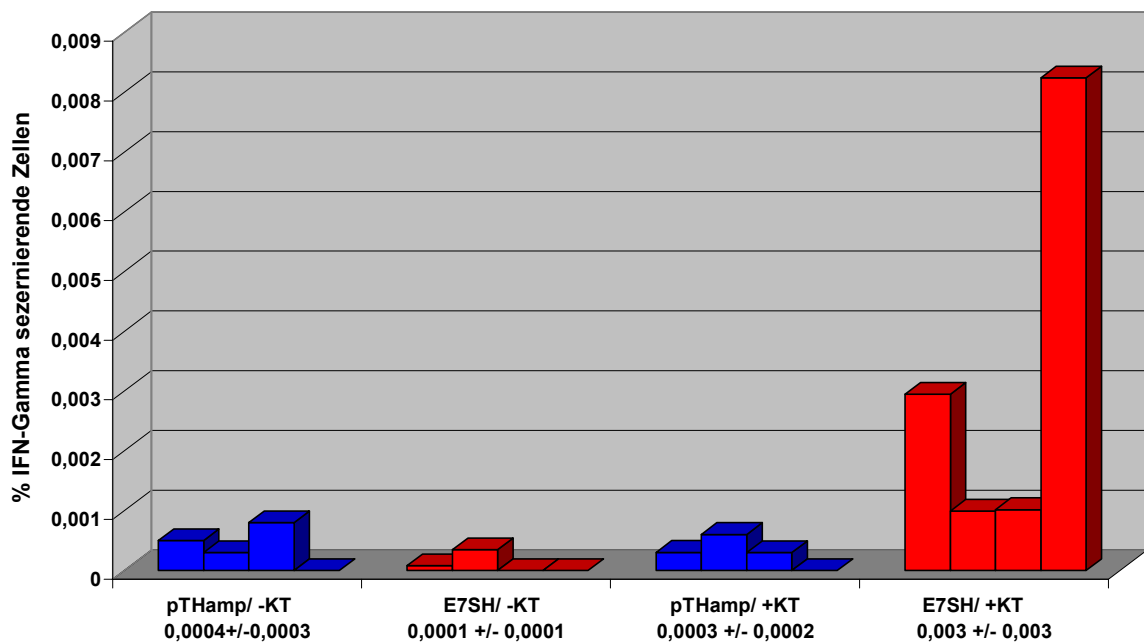
#### 4.4.2 *In vitro* Restimulierung

Zehn Tage nach der zweiten DNA-Immunisierung wurden den Mäusen die Milzen entnommen und von jeder Milz eine Milzzell-Kultur angelegt (siehe 3.6.1). Die Zellen wurden mit den 2F11- bzw. RMA-Transfektanten *in vitro* restimuliert (siehe 3.6.3). Die weiteren *in vitro* Restimulierungen erfolgten im wöchentlichen Abstand. Von einem Teil der Zellen wurde am Tag der Milzzellentnahme ein Interferon- $\gamma$ -Elispot-Assay (siehe 3.6.4) *ex vivo* durchgeführt. Die weiteren Elispot-Assays wurden jeweils 5 Tage nach den Restimulierungen durchgeführt.

#### 4.4.3 Quantifizierung des Kardiotoxin-Einsatzes

Im **Experiment A** sollte der Effekt von Kardiotoxin (KT) untersucht werden. KT ruft nach intramuskulärer Injektion einen inflammatorischen Prozess im Muskelgewebe hervor (Davis 2005), woraufhin es zu einer Rekrutierung diverser Immunzellen kommt. Diese Immunzellen ermöglichen eine effektivere Immunantwort. Acht Tieren wurde 5 Tage vor der DNA-Immunisierung das Adjuvants KT (Tag 1) appliziert (siehe 3.5.2), acht weitere Mäuse blieben ohne KT-Vorbehandlung. Am 6. und 16. Tag wurden jeweils vier Tiere aus den +KT/ -KT-Gruppen mit dem pTHamp-E7SH oder dem pTHamp-Leervektor immunisiert (siehe 3.5.3). Die Milzen der Tiere wurden am 26. Tag entnommen und die aufgeteilten Zellsuspensionen mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten *in vitro* restimuliert (siehe 3.6.3). Wöchentlich erfolgte eine weitere *in vitro* Restimulierung. In diesem sowie in allen folgenden Elispot-Assays blieben die Negativ-Kontrollen unbehandelt. Die ausgezählten Spots der Negativ-Kontrolle wurden von den Spots in der Probe (2F11/RMA) abgezogen. Die Zahlen in den Elispot-Abbildungen geben die Anzahl an IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen (in % der eingesetzten Milzzellen) an. Im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay (*ex vivo*) (siehe Abb. 4/14) erkennt man, dass sich nur bei den mit pTHamp-E7SH-immunisierten und mit Kardiotoxin vorbehandelten Tieren IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen nachweisen lassen. Die Kontrollen mit pTHamp-Leervektor bleiben - wie erwartet - sowohl mit als auch ohne Kardiotoxin negativ. Eine Zusammenfassung des Experiments zeigt Übersichtstabelle A. Aufgrund des Ergebnisses dieses Experimentes wurde den Tieren bei allen folgenden Versuchen das Adjuvants Kardiotoxin 5 Tage vor der DNA-Applikation appliziert.

## IFN-Gamma Elispot-Assay: Exp.A (ex vivo)



**Abb 4/14: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay zur Untersuchung des Kardiotoxin-Effekts hinsichtlich der Steigerung der zellulären Immunantwort nach DNA-Vakzinierung.** Den Tieren (n=4/ Gruppe) wurde zweimal pTHamp-E7SH-DNA bzw. pTHamp-DNA (Kontrolle) i.m. injiziert. Den +KT-Gruppen wurde 5 Tage vor der DNA-Immunisierung das Adjuvants Kardiotoxin appliziert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten kultiviert. Die Negativ-Kontrolle im Elispot blieb unbehandelt. Die ausgezählten Spots der Negativ-Kontrolle wurden von den Spots in der Probe (2F11/RMA) abgezogen. Die Zahlen geben die Anzahl an IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen (in % der eingesetzten Milzzellen) an.

Experiment A	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.
IFN- $\gamma$ Elispot-Assay	Abb. 4/14	n.v.	n.v.	n.v.

#### Übersichtstabelle A: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment A

Im Elispot-Assay nach der 1. und 2. *in vitro* Rest. konnten keine Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Nach der 3. *in vitro* Rest. zeigten auch die Milzzellen der Kontrolltiere eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion, diese Assays wurden nicht ausgewertet. (n.v. = Assay wurde durchgeführt, die Daten sind jedoch nicht verfügbar.)

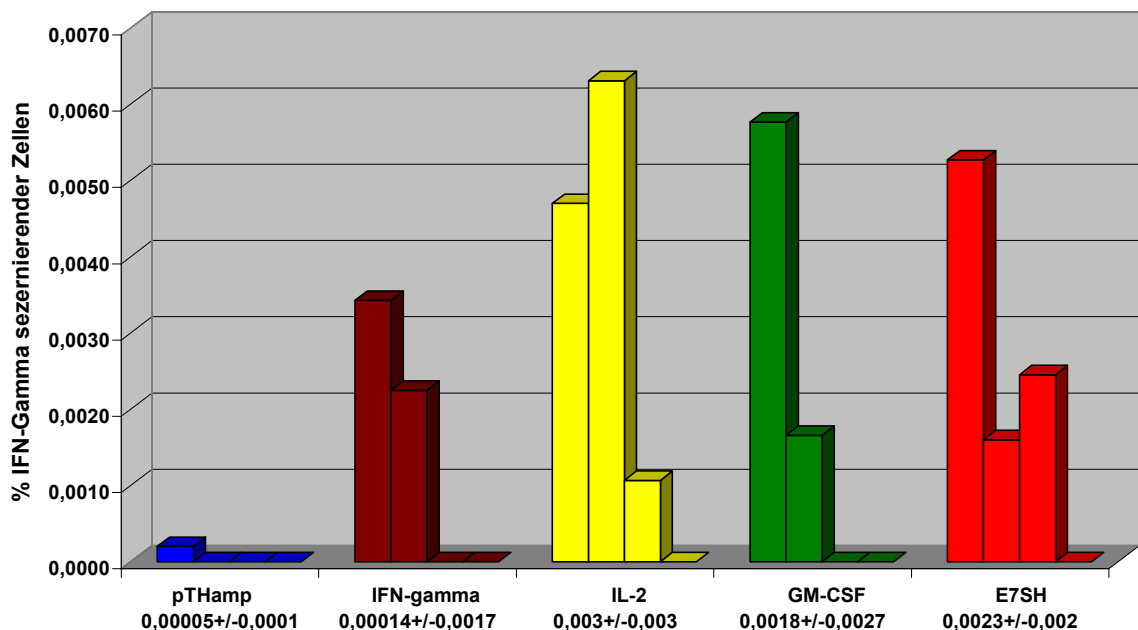
#### 4.4.4 Quantifizierung der spezifischen zellulären Immunantwort nach Immunisierungen mit pTHamp-HPV16-E7SH in Kombination mit adjuvanten Genen

In **Experiment B** wurden 5 Gruppen (n=4/ Gruppe) gebildet. Alle Tiere wurden am Tag 1 mit KT vorbehandelt. An den Tagen 6 und 16 wurden die Plasmid-Konstrukte (E7SH +/- adjuvante Gene) appliziert. Drei Gruppen erhielten pTHamp-E7SH-DNA und zusätzlich

pTHamp-GM-CSF-, oder pTHamp-IFN- $\gamma$ - oder pTHamp-IL-2-DNA. Als Vergleichsgruppe wurde eine Gruppe nur mit dem pTHamp-E7SH-Konstrukt immunisiert. Als Negativkontrolle wurde der 5. Gruppe der Leervektor pTHamp injiziert.

Nach der 1. Restimulierung (siehe Abb. 4/15) konnte in der Gruppe der E7SH/IL2-immunisierten Tiere sowie in der Gruppe der nur mit dem E7SH-Konstrukt immunisierten Tiere in jeweils 3 von 4 Tieren eine spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion detektiert werden. Wobei die Prozentzahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen in der E7SH/IL-2 Gruppe (0,003 +/- 0,003%) höher als in der E7SH-Gruppe (0,0023 +/- 0,002%) war (Kontrolle 0,00005 +/- 0,0001%). In den E7SH/GM-CSF bzw. E7SH/IFN- $\gamma$  Gruppen zeigten je 2 von 4 Tieren eine IFN- $\gamma$ -Sekretion. Die mit GM-CSF geimpfte Gruppe lag bei 0,0018 +/- 0,0027%, die mit pTHamp-IFN- $\gamma$ -immunisierte Gruppe bei 0,00014 +/- 0,0017% IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen. Vergleicht man bei diesem Experiment die adjuvante Wirkung der verschiedenen Konstrukte, so ist nur durch das Adjuvants IL-2 eine Steigerung der zellulären Immunantwort zu erzielen. Eine Zusammenfassung dieses Experimentes zeigt Übersichtstabelle B.

**IFN-Gamma Elispot-Assay: Exp.B (1.Rest.)**



**Abb. 4/15: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay nach 1. Rest. zur Untersuchung des immunologischen Potentials der als Adjuvantien eingesetzten Zytokine GM-CSF, IL-2 und IFN- $\gamma$ .** Den Tieren (Kontrolle pTHamp) wurde das E7SH-DNA-Konstrukt appliziert. Wie angegeben wurde z.T. ein adjuvantes Gen (GM-CSF, IL-2 oder IFN- $\gamma$ ) ko-appliziert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten ko-kultiviert.

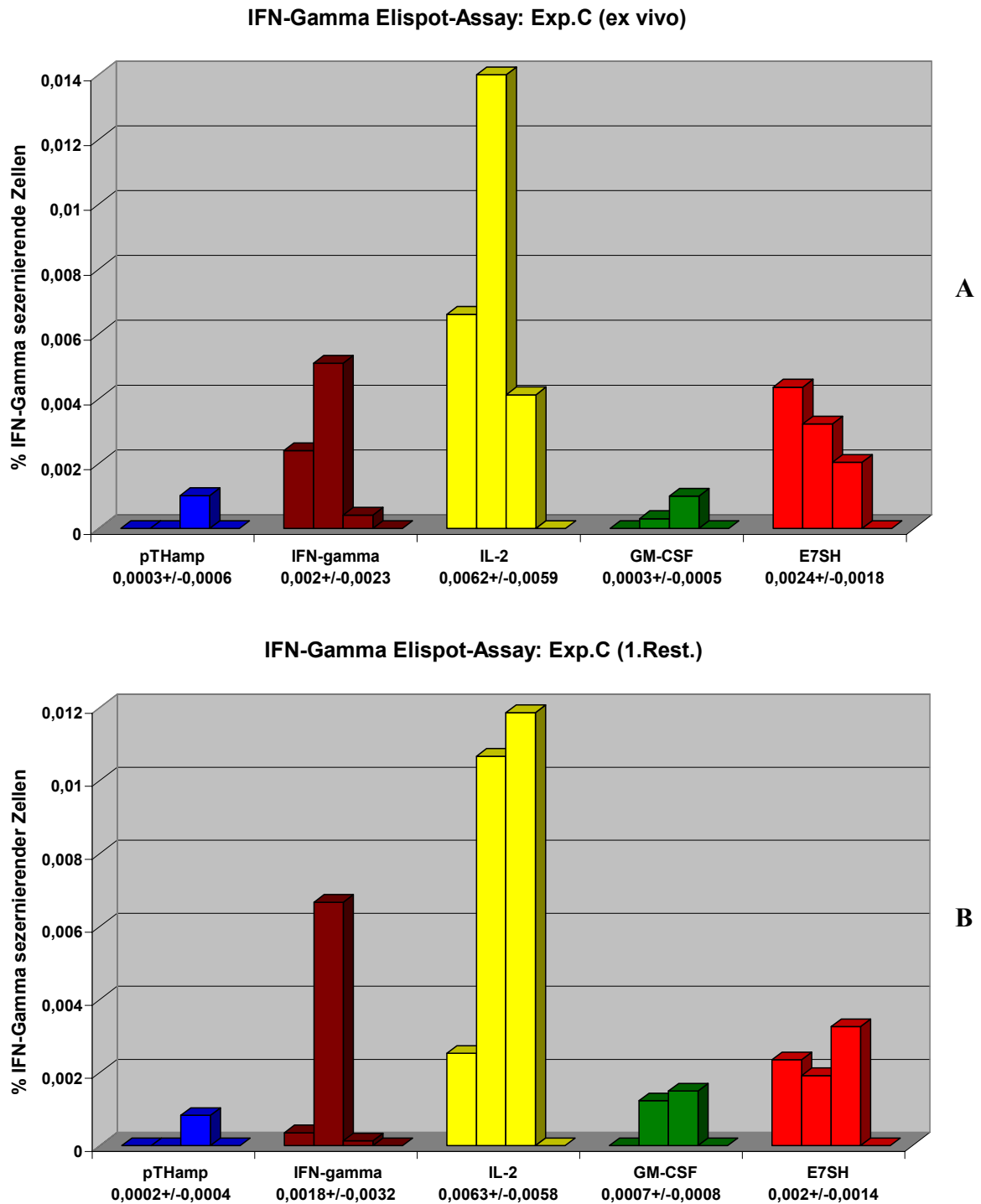
Experiment B	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.
IFN- $\gamma$ Elispot- Assay	n.v.	Abb. 4/15	n.v.	n.v.

**Übersichtstabelle B: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment B**

Im Elispot-Assay *ex vivo* und nach der 2. *in vitro* Rest. konnten keine Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Nach der 3. *in vitro* Rest. zeigten auch die Kontrolltiere eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion, diese Assays wurden nicht ausgewertet.

In **Experiment C** wurden 5 Gruppen mit je 4 Mäusen gebildet. Alle Tiere wurden am Tag 1 mit KT vorbehandelt. An den Tagen 6 und 16 wurden die Plasmid-Konstrukte (E7SH +/- adjuvante Gene) appliziert. Drei Gruppen erhielten pTHamp-E7SH-DNA und zusätzlich pTHamp-GM-CSF-, oder pTHamp-IFN- $\gamma$ - oder pTHamp-IL-2-DNA. Als Vergleichsgruppe wurde eine Gruppe nur mit dem pTHamp-E7SH-Konstrukt immunisiert. Als Negativkontrolle wurde der 5. Gruppe der Leervektor pTHamp injiziert.

In diesem Experiment konnten die Elispot-Assays *ex vivo* und nach der 1. Restimulierung ausgewertet werden. Sowohl *ex vivo* (siehe Abb. 4/16 A) als auch nach der 1. Restimulierung (siehe Abb. 4/16 B) zeigten 3 von 4 Tieren der E7SH/IL-2 Gruppe, sowie 3 von 4 Tieren der nur mit dem E7SH-Konstrukt immunisierten Tiere, eine IFN- $\gamma$ -Sekretion. In beiden Elispot-Assays waren die Prozente an IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen in der mit dem adjuvanten Gen IL-2-immunisierten Gruppe (*ex vivo*: 0,0062 +/- 0,0059%, 1.Rest.: 0,0063 +/- 0,0058%) entscheidend größer als in der E7SH-Gruppe (*ex vivo*: 0,0024 +/- 0,0018%, 1.Rest.: 0,002 +/- 0,0014%). Die Werte der Kontrollgruppe lagen *ex vivo* bei 0,0003 +/- 0,0006 und nach der 1. Rest. bei 0,0002 +/- 0,0004. Für die Tiergruppen, welche die E7SH-DNA und zusätzlich pTHamp-GM-CSF bzw. pTHamp-IFN- $\gamma$  verabreicht bekamen, zeigte sich sowohl für GM-CSF (*ex vivo*: 0 von 4 Tieren positiv, 0,0003 +/- 0,0005% IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen, 1.Rest.: 1 von 4 Tieren positiv; 0,0007 +/- 0,0008% IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen) als auch für IFN- $\gamma$  (*ex vivo*: 2 von 4 Tieren positiv, 0,002 +/- 0,0023% IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen, 1.Rest.: 1 von 4 Tieren positiv, 0,0018 +/- 0,0032% IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen) keine Steigerung der zellulären Immunantwort im Verhältnis zur E7SH-Gruppe. In Kontrast zum erwarteten Ergebnis, zeigte sich bei zusätzlicher Immunisierung dieser möglichen Adjuvantien eine verringerte Zahl IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen. Eine Zusammenfassung der in diesem Experiment durchgeführten Assays zeigt Übersichtstabelle C.



**Abb. 4/16: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays zur Untersuchung des immunologischen Potentials der als Adjuvantien eingesetzten Zytokine GM-CSF, IL-2 und IFN- $\gamma$ . A: *ex vivo*, B: nach 1. Rest.: Den Tieren (Kontrolle pTHamp) wurde das E7SH DNA-Konstrukt appliziert. Wie angegeben wurden z.T. ein adjuvantes Gen (GM-CSF, IL-2 oder IFN- $\gamma$ ) ko-appliziert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten ko-kultiviert.**

Experiment C	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.
<b>IFN-<math>\gamma</math> Elispot- Assay</b>	Abb. 4/16 A	Abb. 4/16 B	n.v.	n.v.
<b>Zytotoxizitäts- Assay</b>	n.d.	n.d.	n.v.	n.v.

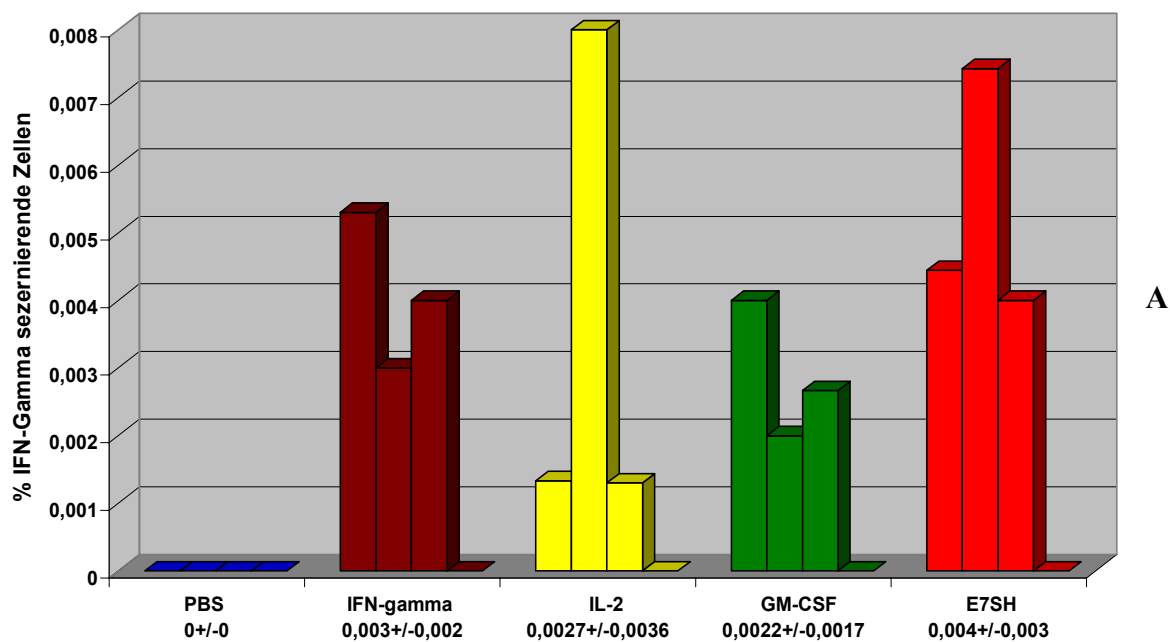
#### Übersichtstabelle C: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment C

Im Elispot-Assay nach der 2. Rest. konnten kaum Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Nach der 3. *in vitro* Rest. zeigten auch die Kontrolltiere eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion, diese Assays wurden nicht ausgewertet. Im Zytotoxizitätsassay zeigten sowohl nach der 3. als auch nach der 4. *in vitro* Rest. die Kontrollen eine starke Lyse (*in vitro* Priming), von einer Auswertung wurde daher abgesehen. (n.d. = Assay wurde nicht durchgeführt).

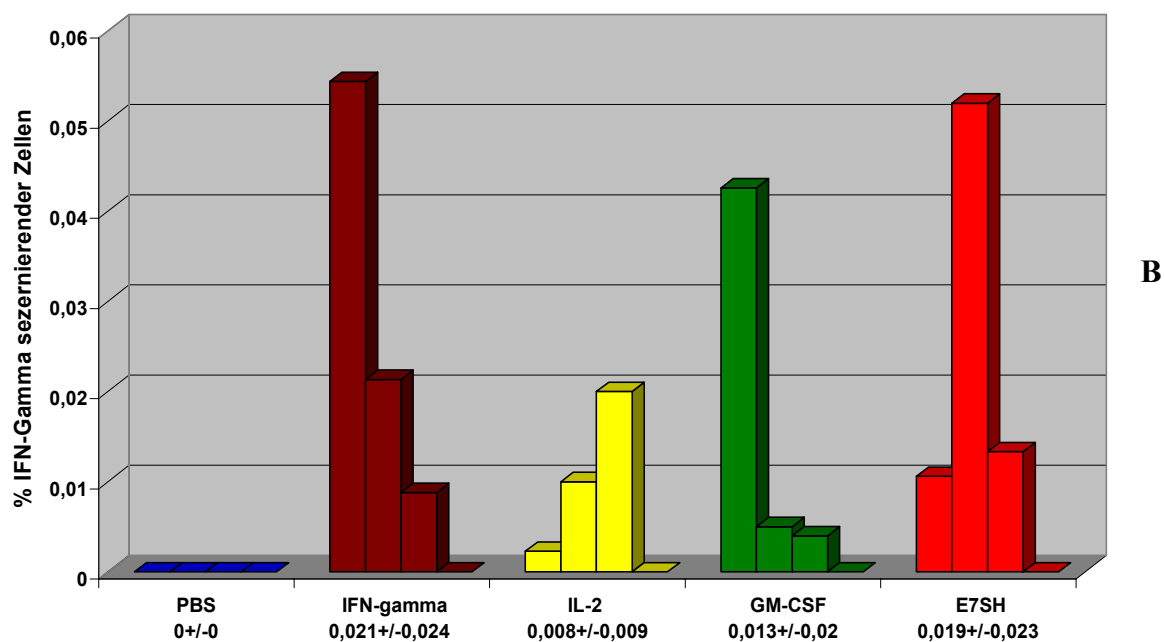
Das **Experiment D** wurde analog zu Experiment C durchgeführt. Der Unterschied zum Experiment C bestand darin, dass als Kontrolle nicht pTHamp-Leervektor-DNA, sondern PBS eingesetzt wurde. Nach der zweiten Restimulierung (siehe Abb. 4/17 A) zeigten alle Gruppen, außer der Kontrollgruppe, bei 3 von 4 Tieren eine spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion. Es lässt sich jedoch keine Steigerung der zellulären Immunantwort durch eines der adjuvanten Gene darstellen. Der höchste Prozentsatz an IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen lässt sich in der E7SH-Gruppe nachweisen (0,004 +/- 0,003% IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen). Die zusätzlich mit den adjuvanten Genen immunisierten Tiere liegen im Mittel unter dem Prozentsatz der E7SH-Gruppe (IFN- $\gamma$ : 0,003 +/- 0,002%; IL-2: 0,0027 +/- 0,004%; GM-CSF: 0,0022 +/- 0,0017%). Nach der dritten Restimulierung zeigte sich das gleiche Bild. Bei allen Gruppen außer der Kontrolle waren wieder 3 von 4 Tieren positiv für eine IFN- $\gamma$ -Sekretion (siehe Abb. 4/17 B). Es lässt sich in diesem Experiment jedoch keine Steigerung der zellulären Immunantwort durch eines der adjuvanten Gene nachweisen. Die mit pTHamp-IFN- $\gamma$ -immunisierte Gruppe liegt zwar mit 0,021 +/- 0,024% IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen leicht über dem Mittelwert der mit pTHamp-E7SH-DNA immunisierten Gruppe (0,019 +/- 0,023%), aber eine aussagekräftige Steigerung der Immunantwort ist daraus nicht abzuleiten. Die adjuvanten Gene IL-2 und GM-CSF erzielen in diesem Elispot eine schlechtere zelluläre Immunantwort (IL-2: 0,008 +/- 0,009% und GM-CSF: 0,013 +/- 0,02%) als die E7SH-Gruppe. Auch im Elispot-Assay nach der 4. Restimulierung liegen die verschiedenen Gruppen nahe beieinander (siehe Abb. 4/17 C). Es zeigt sich in der mit E7SH-DNA-immunisierten sowie in der mit dem E7SH-und pTHamp-IL-2-DNA-immunisierten Gruppe eine IFN- $\gamma$ -Sekretion bei 3 von 4 Tieren. Die IL-2 Gruppe liegt mit 0,01 +/- 0,009% IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen leicht über den Prozenten der E7SH-Gruppe (0,008 +/- 0,006%). Eine aussagekräftige Steigerung der

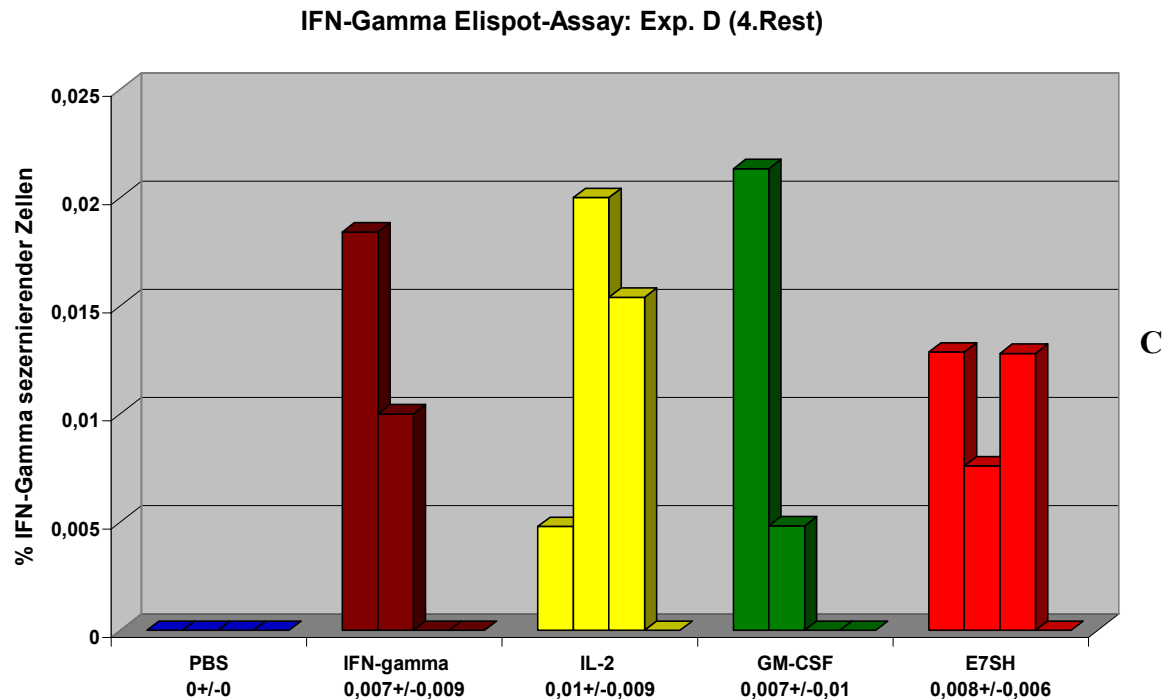
Immunantwort lässt sich daraus aber ebenfalls nicht ableiten. Bei den Konstrukten GM-CSF (0,007 +/- 0,01%) und IFN- $\gamma$  (0,007 +/- 0,009%) zeigten im Elispot-Assay nur 2 von 4 Tieren eine IFN- $\gamma$ -Sekretion. Die durchgeführten  $^{51}$ Chrom-Freisetzungs-Assays konnten nicht ausgewertet werden, da bereits bei den Kontrollen eine starke Lyse (*in vitro* Priming) zu erkennen war. Insgesamt lässt sich sagen, dass in diesem Experiment keine Steigerung der zellulären Immunantwort durch eines der adjuvanten Gene nachzuweisen war. Eine Zusammenfassung der durchgeführten Assays zeigt Übersichtstabelle D.

IFN-Gamma Elispot-Assay: Exp.D (2.Rest.)



IFN-Gamma Elispot-Assay: Exp.D (3.Rest.)





**Abb. 4/17: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays zur Untersuchung des immunologischen Potentials der als Adjuvantien eingesetzten Zytokine GM-CSF, IL-2 und IFN- $\gamma$ . A: nach 2. Rest., B: nach 3. Rest., C: nach 4. Rest.:** Den Tieren (Kontrolle PBS) wurde das E7SH DNA-Konstrukt appliziert. Wie angegeben wurden z.T. ein adjuvantes Gen (GM-CSF, IL-2 oder IFN- $\gamma$ ) ko-appliziert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten ko-kultiviert.

Experiment D	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.	nach vierter <i>in vitro</i> Rest.
IFN- $\gamma$ Elispot-Assay	n.v.	n.v.	Abb. 4/17 A	Abb. 4/17 B	Abb. 4/17 C
Zytotoxizitäts-Assay	n.d.	n.d.	n.v.	n.v.	n.d.

**Übersichtstabelle D: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment D**

In den Elispot-Assays *ex* und nach der 1. *in vitro* Rest. konnten keine Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Im Zytotoxizitätsassay zeigten sowohl nach der 3. als auch nach der 4. *in vitro* Rest. die Kontrollen eine starke Lyse (*in vitro* Priming), von einer Auswertung wurde daher abgesehen.



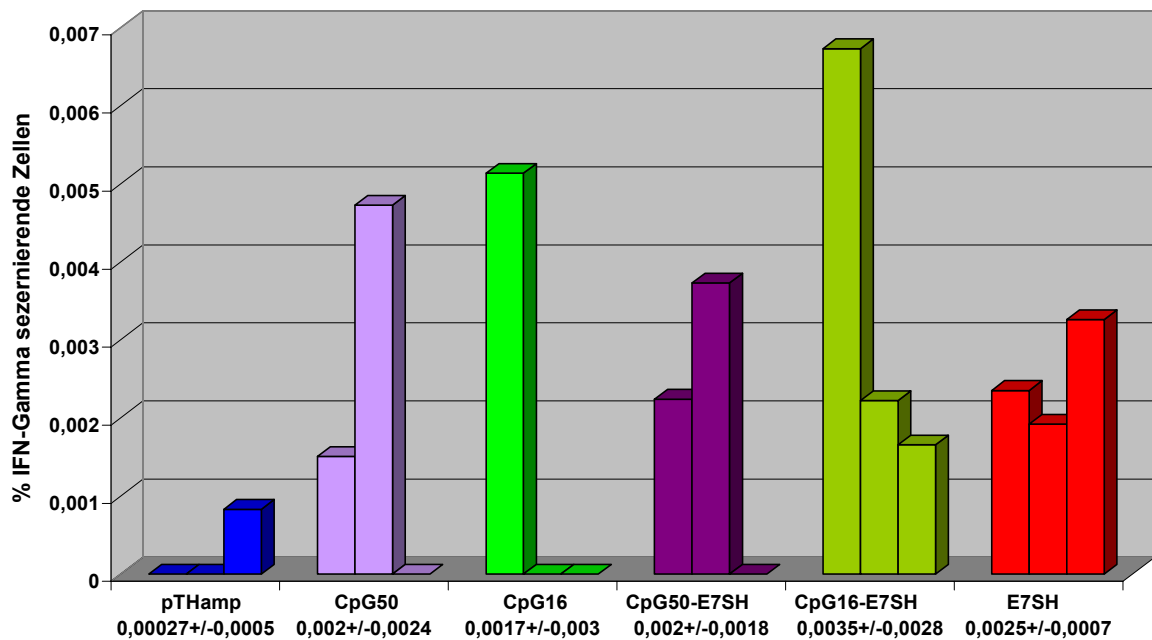
#### 4.4.5 Quantifizierung der spezifischen zellulären Immunantwort nach Immunisierungen mit CpG50-HPV16-E7SH-DNA oder CpG16-HPV16-E7SH-DNA versus pTHamp-HPV16-E7SH-DNA

In verschiedenen Studien wurden die CpG-Motive als potente Aktivatoren der TH<sub>1</sub>-Immunantwort beschrieben. Kim et al. (2000) fanden in einer Vergleichsstudie von 19 verschiedenen potentiellen Adjuvantien für CPG-ODNs die stärkste TH<sub>1</sub>-Immunantwort gegenüber einem Tumorantigen. In den folgenden Experimenten soll deshalb der pTHamp-Vektor mit den beiden CpG-Vektoren verglichen werden. Als Modellantigen dient hierbei das E7SH-Gen.

Im **Experiment E** wurden 6 Gruppen (n=3 Tiere/ Gruppe) gebildet. Am Tag 1 des Experiments wurde allen Tieren das Adjuvants KT intramuskulär injiziert. An den Tagen 6 und 16 erfolgten die DNA-Immunisierungen. Zwei Gruppen bekamen jeweils den Leervektor CpG50 bzw. CpG16 appliziert. Die Gruppen drei und vier wurden mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten DNA-Konstrukten (siehe 4.2) CpG50-HPV16-E7SH (CpG50-E7SH) bzw. CpG16-HPV16-E7SH (CpG16-E7SH) immunisiert. Der Gruppe fünf wurde die pTHamp-E7SH-DNA und der Gruppe sechs der pTHamp-Leervektor (Kontrolle) appliziert. Vom Experiment E konnte der Elispot-Assay nach der 1. Restimulierung (siehe Abb. 4/18) ausgewertet werden. In den mit CpG16-E7SH und pTHamp-E7SH-immunisierten-Gruppen zeigten 3 von 3 Tieren eine IFN- $\gamma$ -Sekretion. Die Prozentsätze an IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen lagen bei der CpG16-E7SH-immunisierten Gruppe bei 0,0035 +/- 0,0028% und in der pTHamp-E7SH-Gruppe bei 0,0025 +/- 0,0007%. In der mit dem Leervektor CpG16 immunisierten Gruppe konnte bei 1 von 3 Tieren eine IFN- $\gamma$ -Sekretion (0,0017 +/- 0,003%) nachgewiesen werden. Bei den mit dem CpG50-Vektor immunisierten Tieren waren sowohl in der Leervektor-Gruppe (0,002 +/- 0,0024%) als auch in der E7SH-Gruppe (0,002 +/- 0,0018%) 2 von 3 Tieren positiv für eine spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion. Betrachtet man die Leervektoren CpG50 bzw. CpG16 zeigt sich, dass die CpG-Vektoren (CpG50 0,002 +/- 0,0024%, CpG16 0,0017 +/- 0,003%) eine stärkere E7-spezifische IFN- $\gamma$  Sekretion induzieren als der pTHamp-Leervektor (0,00027 +/- 0,0005%).

Insgesamt zeigt sich, dass das CpG16-E7SH-Konstrukt dem pTHamp-E7SH-Vektor hinsichtlich der Induktion IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen überlegen ist (Mittelwert IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen). Im Rahmen dieses Experimentes waren nicht alle Assays auswertbar, eine Zusammenfassung zeigt Übersichtstabelle E.

## IFN-Gamma Elispot-Assay: Exp.E (1.Rest.)



**Abb. 4/18: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay zur Untersuchung des immunologischen Potentials der CpG-Vektoren.** Den Tieren wurden die Leervektoren (pTHamp, CpG50, CpG16) bzw. die E7SH-Konstrukte (pTHamp-E7SH, CpG50-E7SH, CpG16-E7SH) appliziert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten ko-kultiviert.

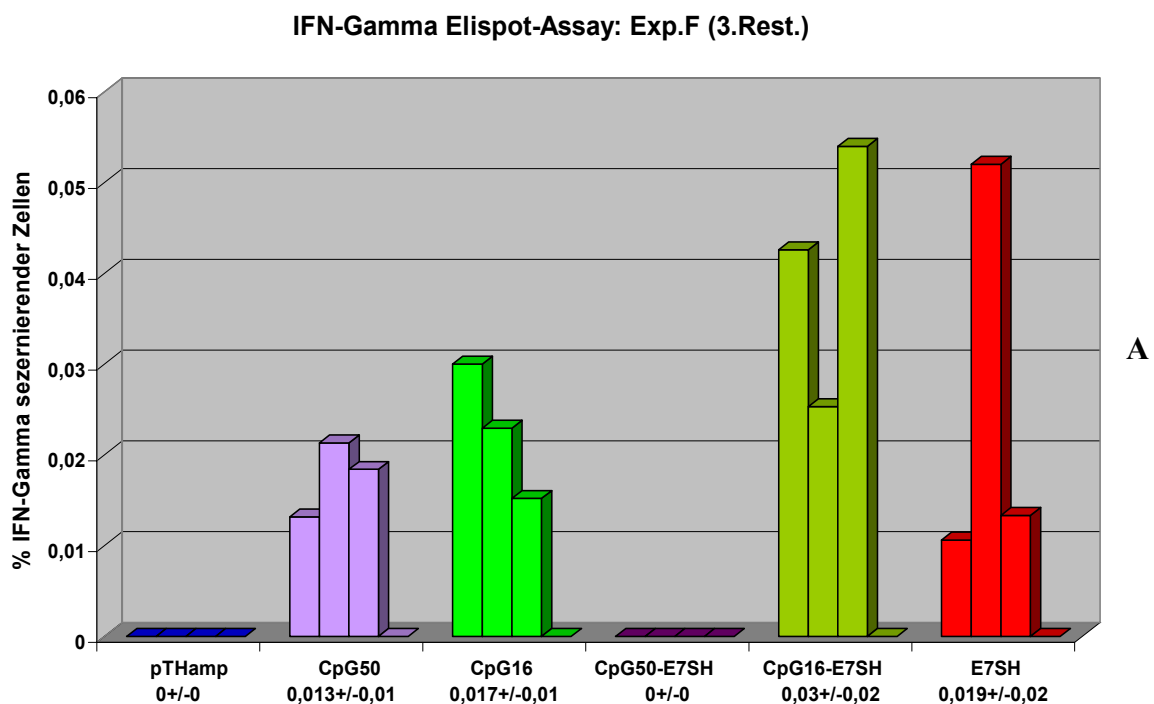
Experiment E	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.
IFN- $\gamma$ Elispot-Assay	n.v.	Abb. 4/18	n.v.	n.v.

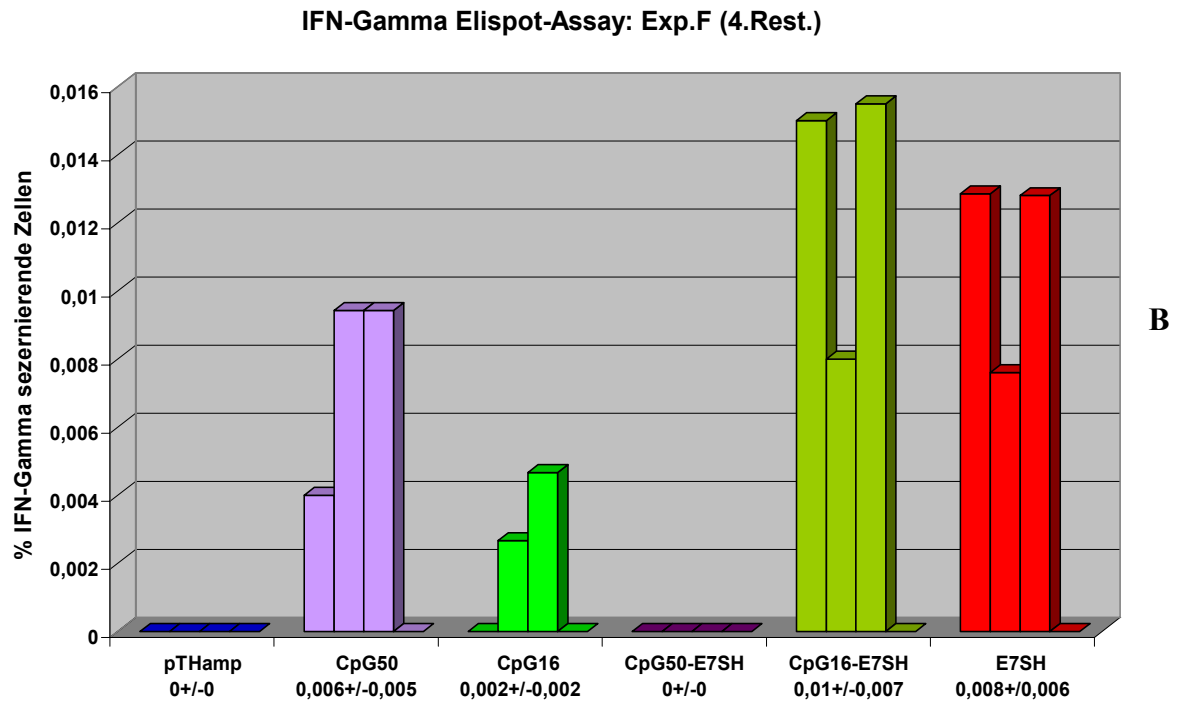
**Übersichtstabelle E: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment E**

In den Elispot-Assay *ex vivo* und nach der 2. Rest. konnten kaum Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Nach der 3. *in vitro* Rest. zeigten auch die Kontrolltiere eine starke IFN- $\gamma$ -Sekretion, diese Assays wurden nicht ausgewertet.

Im **Experiment F** wurden entsprechend dem Experiment E die CpG-Vektoren getestet. Es wurden 6 Gruppen mit je 4 Tieren gebildet. Jeweils drei Gruppen erhielten die verschiedenen Leervektoren pTHamp, CpG50 oder CpG16. Die anderen Gruppen wurden mit den Konstrukten CpG50-E7SH, CpG16-E7SH oder pTHamp-E7SH immunisiert. Es konnten die Elispot-Assays nach der dritten und vierten Restimulierung ausgewertet werden (siehe Abb. 4/19). Beim Vergleich der Leervektoren zeigte sich, dass beide CpG-Vektoren eine stärkere Induktion IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen hervorrufen als der pTHamp-Vektor. Beim pTHamp-Vektor waren sowohl nach der dritten als auch nach der vierten Restimulierung keine

Milzzell-Kulturen positiv für IFN- $\gamma$ . Hingegen zeigten sich beim CpG50-Leervektor nach der dritten (0,013  $\pm$  0,01%) und nach der vierten Restimulierung (0,006  $\pm$  0,005%) 3 von 4 Tieren positiv. Beim CpG16-Vektor waren nach der dritten Restimulierung (0,017  $\pm$  0,01%) 3 von 4 Tieren und nach der Vierten (0,002  $\pm$  0,002%) 2 von 4 Tieren positiv. In den Gruppen, welche mit den E7SH-Konstrukten immunisiert wurden, zeigte sich in beiden Elispot-Assays das gleiche Ergebnis. In der CpG50-E7SH-Gruppe stellten sich keine IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen dar. Es konnte keine der Milzzellsuspensionen positiv für IFN- $\gamma$  getestet werden. Bei den beiden anderen Gruppen, die mit CpG16-E7SH bzw. pTHamp-E7SH immunisiert wurden, zeigten sich in beiden Restimulierungen 3 von 4 Tieren positiv für IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen. Im Elispot-Assay nach der dritten Restimulierung lag der Mittelwert der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen bei CpG16-E7SH bei 0,03  $\pm$  0,02% und nach der vierten Restimulierung bei 0,01  $\pm$  0,007%. Im Gegensatz dazu erbrachte der Elispot-Assay bei der pTHamp-E7SH-DNA nach der dritten Restimulierung einen Wert von 0,019  $\pm$  0,02% und nach der Vierten von 0,008  $\pm$  0,006%. Aus diesen Werten lässt sich schlussfolgern, dass das Konstrukt CpG16-E7SH stärker immunogen wirkt als das pTHamp-E7SH-Konstrukt. Im Gegensatz dazu konnte durch das CpG50-E7SH-Konstrukt in diesem Experiment keine immunogene Wirkung erzielt werden. Im Verlaufe dieses Experimentes waren nicht alle Assays auswertbar. Die Übersichtstabelle F stellt eine Zusammenfassung der durchgeführten Assays dar.





**Abb. 4/19: IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays zur Untersuchung des immunologischen Potentials der CpG-Vektoren. A: nach 3. Rest. B: nach 4. Rest.** Drei Gruppen erhielten die Leervektoren pTHamp, CpG50 oder CpG16. Die anderen Gruppen wurden mit den E7SH-Konstrukten (pTHamp-E7SH, CpG50-E7SH oder CpG16-E7SH) immunisiert. Die Milzzellsuspensionen wurden im IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay mit 2F11- bzw. RMA-Transfektanten ko-kultiviert.

Experiment F	<i>ex vivo</i>	nach erster <i>in vitro</i> Rest.	nach zweiter <i>in vitro</i> Rest.	nach dritter <i>in vitro</i> Rest.	nach vierter <i>in vitro</i> Rest.
<b>IFN-<math>\gamma</math> Elispot-Assay</b>	n.v.	n.v.	n.v.	Abb. 4/19 A	Abb. 4/19 B
<b>Zytotoxizitäts-Assay</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.v.	n.v.

**Übersichtstabelle F: Übersicht über die durchgeführten Assays in Experiment F.** In den Elispot-Assays *ex vivo* sowie der 1. und 2. *in vitro* Rest. konnten kaum Spots (auch nicht in der Positivkontrolle) detektiert werden, eine Auswertung war nicht möglich. Im Zytotoxizitätsassay zeigten sowohl nach der 3. als auch nach der 4. *in vitro* Rest. die Kontrollen eine starke Lyse (*in vitro* Priming), von einer Auswertung wurde daher abgesehen.

#### 4.5. *In vivo* Tumor-Regressions-Experimente

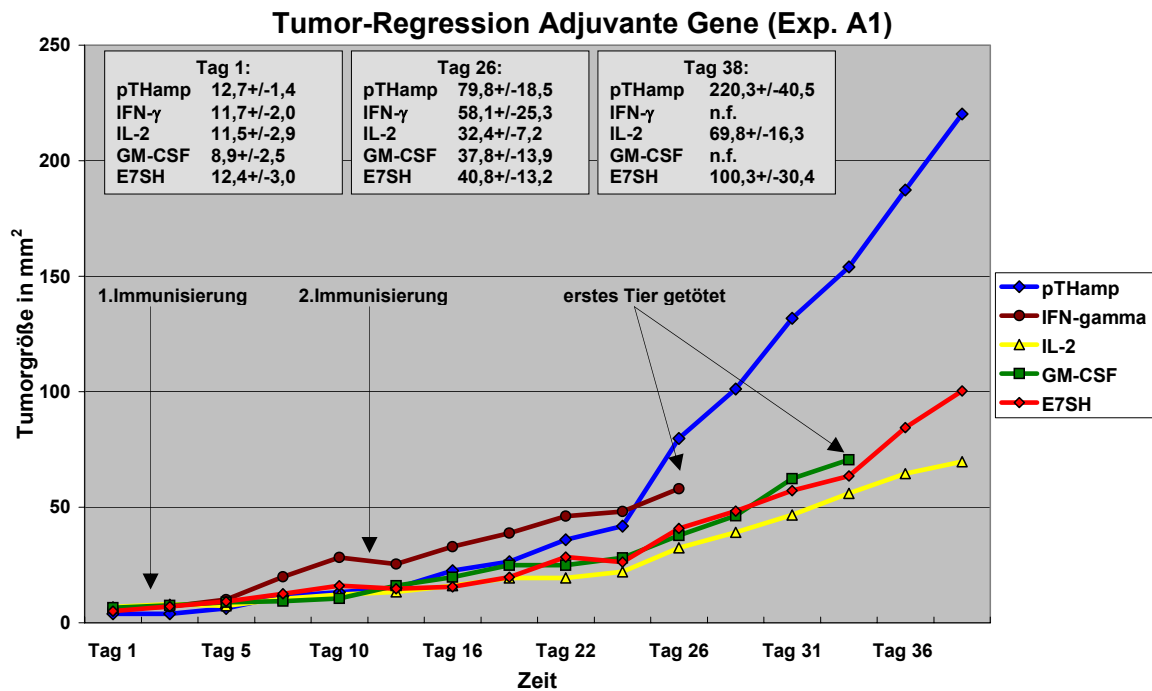
Es wurden jeweils zwei Tumor-Regressions-Experimente mit den adjuvanten Genen (Experiment A1 und A2) und mit den CpG-Konstrukten (Experiment B1 und B2) durchgeführt. Hierzu wurden den Mäusen vor der DNA-Immunisierung C3-Tumorzellen ( $5 \times 10^5$  Zellen pro 100  $\mu$ l PBS) in die rechte rasierte Flanke appliziert (siehe 3.5.4). Nach 8 - 12 Tagen waren im Schnitt bei mehr als 90% der Tiere Tumoren mit einem Durchmesser zwischen 1 und 4mm gewachsen. Es erfolgte nun die DNA-Immunisierung (Tag 1) und die Aufteilung der Tiere in entsprechende Gruppen (siehe Experimente A1, A2, B1 und B2). Die Immunisierungen erfolgten intramuskulär in den Muskulus tibialis anterior (50ug/Muskel, 100ug/Tier, siehe 3.5.3). Zehn bis zwölf Tage nach der ersten DNA-Immunisierung wurden die Tiere ein zweites Mal immunisiert. Ab Tag 1 des Experiments wurden die Tumoren der Tiere alle 2 - 3 Tage ausgemessen. Die Maus, deren Tumor im Durchmesser größer als 1,5cm (Fläche 225mm<sup>2</sup>) war, wurde ausgesondert. Die Experimente wurden beendet, wenn mehrere Tiere, welche nicht mit den Kontrollen (pTHamp-Leervektor, CpG-Leervektor) immunisiert wurden, ausgesondert werden mussten.

##### 4.5.1 Vergleich der zellulären Immunantwort bei Ko-Applikation der adjuvanten Gene GM-CSF, IFN- $\gamma$ und IL-2 zum HPV16-E7SH

Im **Tumor-Regressions-Experiment A1** bekamen 60 Tiere die C3-Tumorzellen appliziert (siehe 3.5.4). Nach 12 Tagen waren in 50 Tieren kleine Tumoren mit einem Durchmesser von 1 - 5mm tastbar, so dass diese Tiere immunisiert werden konnten (Tag 1 des Experimentes). In 6 Tieren war kein Tumorwachstum nachzuweisen und in 4 Tieren waren die Tumoren im Durchmesser größer als 5mm. Diese Tiere konnten nicht für die Immunisierungen verwendet werden und wurden ausgesondert. Bei der Immunisierung 12 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden die Tiere in 5 Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt und dabei eine Randomisierung vorgenommen. Der Gruppe 1 (Tumorgroße in mm<sup>2</sup> 12,7 +/- 1,4) wurde als Kontrollgruppe der Leervektor pTHamp verabreicht. Die Gruppen 2 - 4 wurden mit der pTHamp-E7SH-DNA und zusätzlich mit DNA eines adjuvanten Genes immunisiert. Hierbei bekam Gruppe 2 (Tumorgroße in mm<sup>2</sup> 11,7 +/- 2,0) das pTHamp-IFN- $\gamma$ -Konstrukt, Gruppe 3 (Tumorgroße in mm<sup>2</sup> 11,5 +/- 2,9) das pTHamp-IL-2-Konstrukt und Gruppe 4 (Tumorgroße in mm<sup>2</sup> 8,9 +/- 2,5) das pTHamp-GM-CSF-Konstrukt verabreicht. Die Gruppe 5 (Tumorgroße in mm<sup>2</sup> 12,4 +/- 3,0) erhielt nur die pTHamp-E7SH-DNA (siehe Abb. 4/20). Zehn Tage nach der ersten Immunisierung wurden alle Tiere ein zweites Mal mit den gleichen Konstrukten immunisiert. Am Tag 26 des Experiments musste die erste Maus der Gruppe 2 (IFN- $\gamma$ )

aufgrund von blutigen und offenen Bisswunden an den Tumoren getötet werden (siehe Abb. 4/20). Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich im Vergleich der Tumorgrößen der Gruppen 2 - 5 (Tumorgröße zwischen 32,4 - 58,1mm<sup>2</sup>) noch keine deutlich erkennbaren Wachstumsunterschiede. Im Vergleich zur Kontrolle pTHamp (79,8 +/- 18,5) war zu diesem Zeitpunkt aber bereits eine signifikante Tumor-Regression durch das Konstrukt E7SH/IL-2 (P=0,028) zu detektieren. Die Immunisierungs-Gruppen E7SH (p=0,08) und E7SH/GM-CSF (P=0,09) zeigten im Vergleich zur pTHamp-Gruppe die Tendenz eines langsameren Tumorwachstums. Am 33. Tag des Experimentes musste aufgrund von blutigen und offenen Bisswunden an der Oberfläche der Tumore auch eine Maus aus der E7SH/GM-CSF-Gruppe getötet werden. Das Experiment wurde am 38. Tag beendet, da entweder die Tumore im Durchschnitt eine Fläche von 225 mm<sup>2</sup> (Durchmesser 1,5cm) erreicht hatten oder durch gegenseitige Bisswunden blutig und offen waren. Zu diesem Zeitpunkt konnten die stärksten Tumor-Regressionen in der mit E7SH/IL-2-DNA-immunisierten Gruppe (69,8 +/- 16,3 mm<sup>2</sup>) und in der mit E7SH-DNA-immunisierten Gruppe (100,3 +/- 30,4 mm<sup>2</sup>) detektiert werden. Insgesamt lässt sich in diesem *in vivo* Tumor-Regressions-Experiment durch das Konstrukt E7SH eine signifikante (P=0,04) und durch das Konstrukt E7SH/IL-2 eine hoch signifikante (P=0,005) Tumor-Regression im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (pTHamp) nachweisen. Die bessere Tumor-Regression der E7SH/IL-2-Gruppe ist jedoch nicht signifikant besser als in der E7SH-Gruppe.

Über die adjuvanten Gene IFN- $\gamma$  und GM-CSF lässt sich in diesem Experiment keine Aussage treffen, da in beiden Gruppen vorzeitig Tiere getötet werden mussten. Bis zu diesem Zeitpunkt (Tag 26 E7SH/IFN- $\gamma$  und Tag 33 E7SH/GM-CSF) zeigte sich jedoch bei beiden Konstrukten im Vergleich zur E7SH-Gruppe keine stärkere Tumor-Regression. Eine Zusammenfassung dieses Experimentes A1 zeigt die Übersichtstabelle in Abb. 4/21. Am Ende dieses Experimentes (Tag 38) konnte bei einem Tier aus der E7SH/IL-2-Gruppe (Tag 1: 9mm<sup>2</sup>) und bei einem Tier, welches mit der E7SH-DNA immunisiert wurde (Tag 1: 4mm<sup>2</sup>), eine totale Regression des Tumorwachstums erreicht werden. Bei 2/10 Tieren aus der GM-CSF-Gruppe konnte eine Regression der Tumorgröße auf 0,25mm<sup>2</sup> (Tag 1: 9mm<sup>2</sup>) bzw. 1mm<sup>2</sup> (Tag 1: 4mm<sup>2</sup>) beobachtet werden. Diese 4 Tiere, bei denen kein bzw. ein Tumor mit einer Fläche von maximal 1mm<sup>2</sup> vorhanden waren, wurden für ein Rechallenge-Tumor-Experiment verwendet (siehe 4.6).

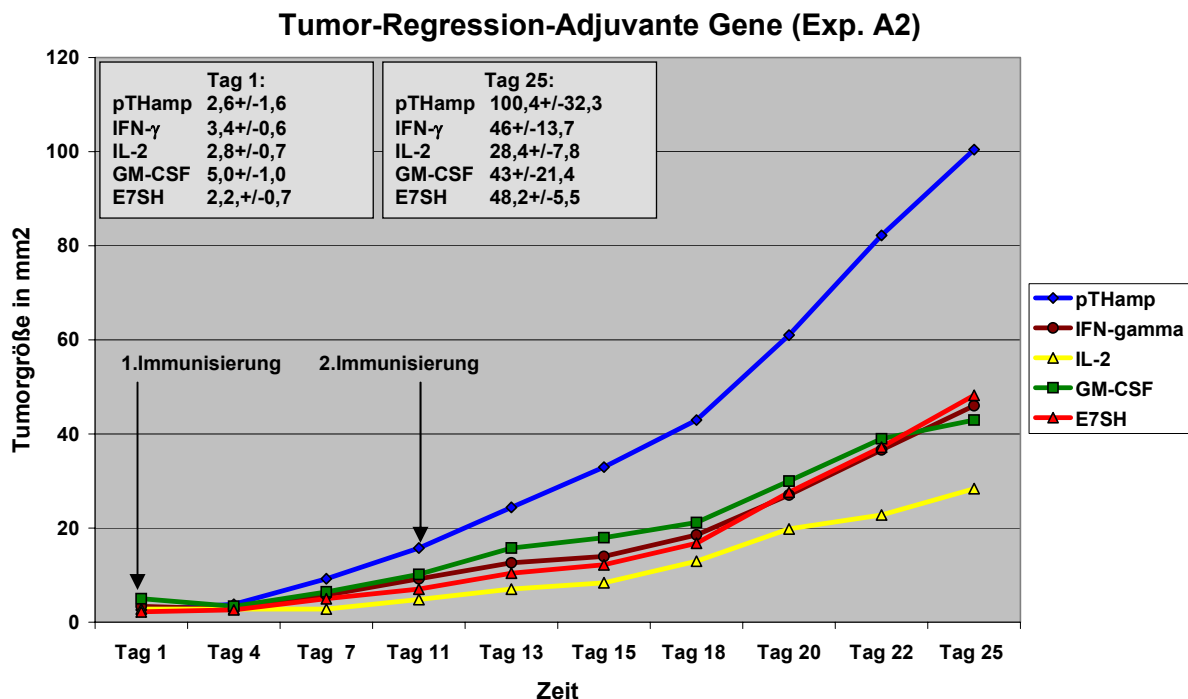


**Abb. 4/20: Tumor-Regressions-Experiment A1:** 12 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden 50 Tiere in 5 Gruppen (10 Tiere/ Gruppe) aufgeteilt und immunisiert (Kontrolle pTHamp). 4 Gruppen erhielten E7SH-DNA. 3 Gruppen bekamen als Ko-Applikation jeweils ein adjuvantes Gen (IFN-γ, IL-2 oder GM-CSF) appliziert. Am 10. Tag erfolgte die 2. Immunisierung. Am Tag 26 (IFN-γ) bzw. 33 (GM-CSF) musste jeweils ein Tier dieser Gruppen ausgesondert werden. Insgesamt konnte gegenüber der E7SH-Gruppe ein geringeres Tumorstadium in der E7SH/IL-2-Gruppe gezeigt werden. Beide Gruppen zeigten gegenüber der Kontrolle pTHamp eine signifikante (E7SH) bzw. hoch signifikante (E7SH/IL-2) Tumor-Regression. (n.f. = nicht feststellbar: in diesen Gruppen wurden bereits Tiere getötet - eine durchschnittliche Tumorgöße kann nicht angegeben werden.)

Tumor-Regression (Experiment A1)	pTHamp- Leervektor	E7SH/IFN-γ	E7SH/IL-2	E7SH/ GM-CSF	E7SH
Durchschnittliche Tumorphäche 10 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	3,9±0,7	5,9±1,4	6,9±1,4	6,6 ±1,5	5,1±1,1
Durchschnittliche Tumorphäche 38 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	79,7± 8,6	58,1±25,3	32,4±7,2	37,8±13,9	40,8±13,2
Durchschnittliche Tumorphäche 50 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	220,3±40,5	n. f.	69,8±16,3	n. f.	100,3±30,4
Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv am Tag 38 (mm <sup>2</sup> : Anzahl der Tiere)	0-24: 0 25-49: 4 50-99: 1 100-149: 4 150-300: 1	0-24: 3 25-49: 5 50-99: 0 100-149: 1 150-300: 1	0-24: 3 25-49: 6 50-99: 1 100-149: 0 150-300: 0	0-24: 5 25-49: 3 50-99: 1 100-149: 1 150-300: 0	0-24: 5 25-49: 2 50-99: 2 100-149: 1 150-300: 0

**Abb. 4/21: Übersichtstabelle Tumor-Regressions-Experiment A 1:** Angegeben ist die durchschnittliche Tumorphäche ± SEM in mm<sup>2</sup> sowie die Verteilung der Tumorgößen im jeweiligen Kollektiv am Tag 38.

Im **Tumor-Regressions-Experiment A2** bekamen 30 Tiere die C3-Tumorzellen appliziert. Es wurden nach 10 Tagen 25 Tiere ausgewählt, welche einen Tumordurchmesser von 1 - 3mm aufwiesen. Diese Tiere wurden auf 5 Gruppen zu je 5 Tieren verteilt. Zehn Tage nach der Tumorzellapplikation wurde die 1. Immunisierung durchgeführt (Tag 1). Die Aufteilung der Gruppen entspricht der Aufteilung im Tumor-Regressions-Experiment A1. Zehn Tage nach der 1. Immunisierung wurden die Tiere ein zweites Mal immunisiert (Tag 11). Im Verlauf des Experimentes zeigte sich bei allen mit E7SH-DNA- (+/- adjuvantes Gen) immunisierten Tieren eine Tumor-Regression im Vergleich zur Kontrolle pTHamp (siehe Abb. 4/22). Mit einer durchschnittlichen Tumorgröße von  $28,4 \pm 7,8 \text{ mm}^2$  liegt die E7SH/IL-2-Gruppe deutlich unter dem Mittelwert der Tumorgröße, welche in der E7SH-Gruppe ( $48,2 \pm 5,5 \text{ mm}^2$ ) gemessen wurde. Bei den adjuvanten Genen GM-CSF ( $43 \pm 21,4 \text{ mm}^2$ ) und IFN- $\gamma$  ( $46 \pm 13,7 \text{ mm}^2$ ) wurde im Vergleich zur E7SH-Gruppe keine Tumor-Regression detektiert. Im t-Test nach Student konnte für das Konstrukt E7SH/IL-2 eine tendenziell ( $P=0,06$ ) bessere Tumor-Regression im Vergleich zur pTHamp-Gruppe errechnet werden. Eine Zusammenfassung von A2 zeigt die Übersichtstabelle in Abb. 4/23. Insgesamt lässt sich nach den Tumor-Experimenten A1 und A2 schlussfolgern, dass von den adjuvanten Genen nur IL-2 in der Lage ist, *in vivo* ein verlangsamtes Tumorwachstum hervorzurufen.



**Abb. 4/22: Tumor-Regressions-Experiment A2:** 10 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden 25 Tiere in 5 Gruppen (5 Tiere/ Gruppe) aufgeteilt und immunisiert (Kontrolle pTHamp). 4 Gruppen erhielten E7SH-DNA. Drei Gruppen der E7SH-vakzinierten Tiere bekamen als Ko-Applikation jeweils ein adjuvantes Gen (IFN- $\gamma$ , IL-2 oder GM-CSF) appliziert. Am 10. Tag erfolgte die 2. Immunisierung. Insgesamt zeigte die E7SH/IL-2-Gruppe das geringste Tumorwachstum. E7SH/GM-CSF- und E7SH/IFN- $\gamma$ - zeigten die gleiche Tumor-Regression wie die E7SH-Gruppe.



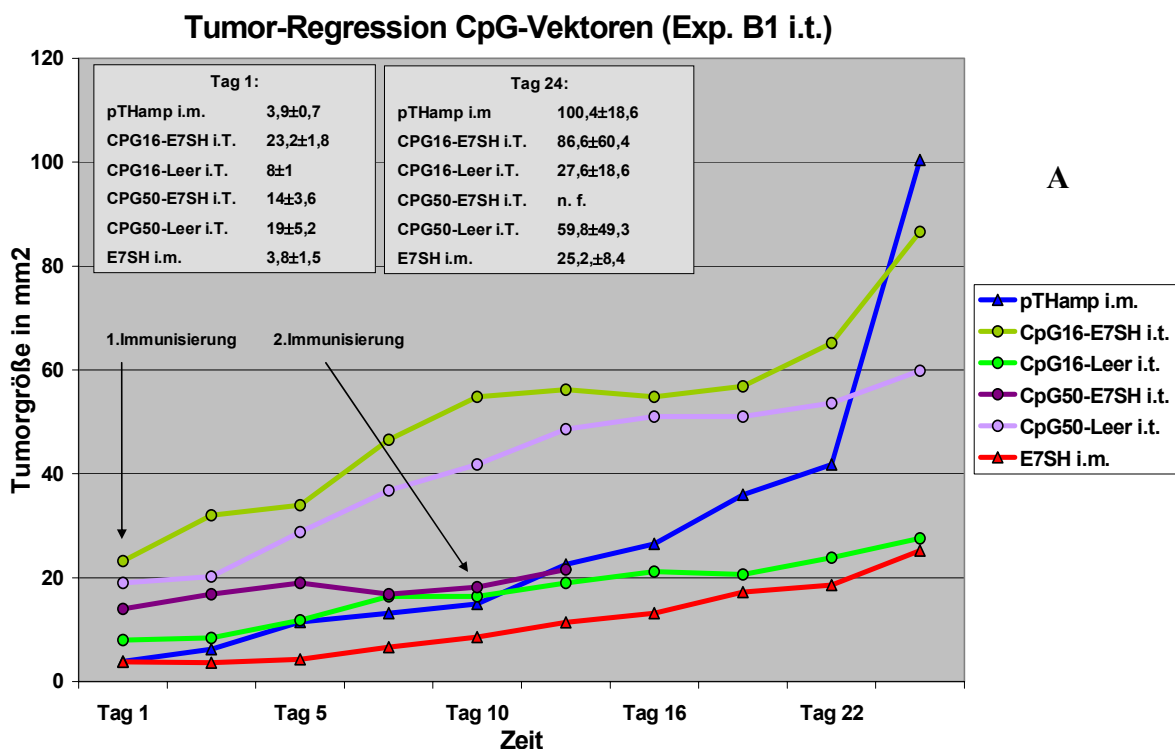
Tumor-Regression (Experiment A2)	pTHamp- Leervektor	E7SH/IFN- $\gamma$	E7SH/IL-2	E7SH/ GM-CSF	pTHamp E7SH
Durchschnittliche Tumorfläche 10 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	2,6 $\pm$ 1,6	3,4 $\pm$ 0,6	2,8 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 1,0	2,2 $\pm$ 0,7
Durchschnittliche Tumorfläche 35 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	100,4 $\pm$ 32,3	46 $\pm$ 13,7	28,4 $\pm$ 7,8	43 $\pm$ 21,4	48,2 $\pm$ 5,5
Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv am Tag 35 (mm <sup>2</sup> : Anzahl der Tiere)	0-24: 0 25-49: 1 50-99: 2 100-149: 2	0-24: 2 25-49: 1 50-99: 2 100-149: 0	0-24: 2 25-49: 3 50-99: 0 100-149: 0	0-24: 2 25-49: 2 50-99: 1 100-149: 0	0-24: 0 25-49: 4 50-99: 1 100-149: 0

**Abb. 4/23: Übersichtstabelle Tumor-Regressions-Experiment A 2:** Angegeben ist die durchschnittliche Tumorfläche  $\pm$  SEM in mm<sup>2</sup> sowie die Verteilung der Tumorgößen im jeweiligen Kollektiv am Tag 35.

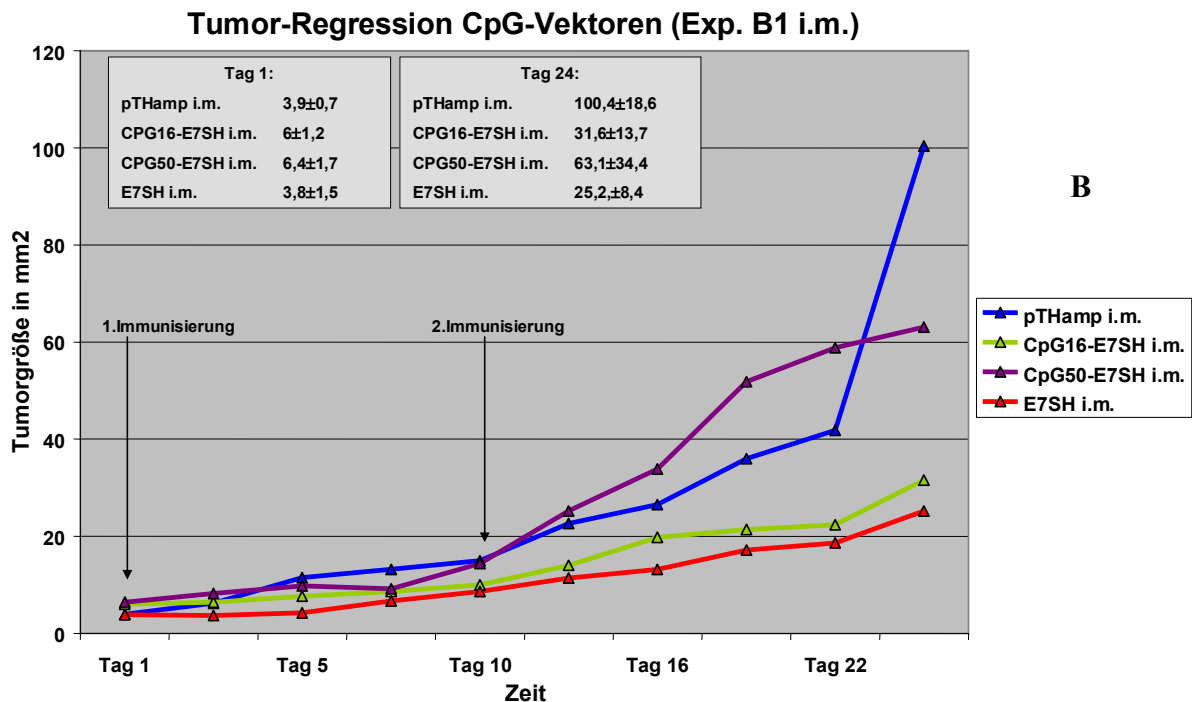
#### 4.5.2 Vergleich der Konstrukte CpG-HPV16-E7SH versus pTHamp-HPV16-E7SH in Bezug auf die Fähigkeit, eine Tumor-Regression zu induzieren

Im **Tumor-Regressions-Experiment B1** bekamen 45 Tiere die C3-Tumorzellen appliziert (siehe 3.5.4). Nach 10 Tagen waren in 40 Tieren kleine Tumoren mit einem Durchmesser von 1 - 6mm tastbar, so dass nach Randomisierung immunisiert werden konnte (Tag 1 des Experimentes). In 2 Tieren war kein Tumorwachstum nachzuweisen und in 3 Tieren waren die Tumoren bereits nach 10 Tagen im Durchmesser größer als 6mm. Diese Tiere konnten nicht für die Immunisierungen verwendet werden und wurden ausgesondert. Vor der Immunisierung (Tag 1) wurden die Tiere in 8 Gruppen zu je 5 Tieren aufgeteilt. Vier Gruppen wurden für eine intratumorale (i.t.) und vier für eine intramuskuläre (i.m.) Immunisierung vorgesehen. Bei der Aufteilung der Gruppen wurde darauf geachtet, dass für die i.t.-Immunisierungen Tiere mit Tumoren eines Durchmessers zwischen 3 und 6mm verwendet wurden, da die Injektion der Konstrukte in einen Tumor kleiner als 3mm praktisch nicht umzusetzen ist. Für die i.m.-Immunisierungen wurden alle Tumoren zwischen 1 und 6mm Durchmesser eingesetzt. Die Konstrukte CpG16-E7SH, CpG-16-Leervektor, CpG50-E7SH und CpG50-Leervektor wurden direkt in den Tumor appliziert. Intramuskulär wurde mit pTHamp-E7SH, pTHamp-Leervektor, CpG50-E7SH und CpG16-E7SH vakziniert. 10 Tage nach der 1. Immunisierung erfolgte eine 2. mit den gleichen Konstrukten. In den Abbildungen 4/24 A und 4/24 B werden die Entwicklungen der Tumorgößen getrennt nach der Applikationsform dargestellt. In beiden Abbildungen stellen die i.m.-injizierten Konstrukte pTHamp-Leervektor und E7SH-DNA die Negativ- bzw. Referenzgruppe dar. Die stärkste und

im Vergleich zur pTHamp-Gruppe signifikante ( $P=0,026$ ) Tumor-Regression wurde durch eine intramuskuläre Immunisierung mit der pTHamp-E7SH-DNA erzielt ( $25,2 \pm 8,4 \text{ mm}^2$ ). Eine ähnlich starke und im Vergleich zur Kontrolle pTHamp i.m. ( $79,9 \pm 18,6 \text{ mm}^2$ ) ebenfalls signifikant ( $P=0,048$ ) bessere Tumor-Regression wurde durch CpG16-E7SH i.m. ( $31,6 \pm 13,7 \text{ mm}^2$ ) erreicht. Zu einer tendenziell ( $P=0,053$ ) besseren Tumor-Regression führte die intratumorale Applizierung des CpG16-Leervektors ( $27,6 \pm 18,6 \text{ mm}^2$ ). Weder der CpG50-Leervektor noch das CpG50-E7SH-Konstrukt zeigten in diesem Experiment (i.t. und i.m.) eine Tumor-Regression. Die Gruppe, welche die CpG50-E7SH-DNA i.t. appliziert bekam, konnte in diesem Experiment nicht beurteilt werden, da bereits am Tag 12 zwei Tiere dieser Gruppe aufgrund offener, blutiger Bisswunden getötet werden mussten. Bis zu diesem Zeitpunkt (Tag 10) konnte zwischen den immunisierten Gruppen noch kein aussagekräftiger Unterschied der Tumor-Regression ermittelt werden. CpG16-E7SH i.t. und CpG50-Leervektor i.t. zeigten im Vergleich zu den anderen Konstrukten ein starkes Tumorstadium. Insgesamt lässt sich am Ende dieses Experimentes (Tag 24) keine Steigerung der Tumor-Regression durch die verschiedenen CpG-Vektor-Konstrukte im Vergleich zu den pTHamp-Vektor-Konstrukten detektieren. In der Übersichtstabelle in Abb. 4/25 wird eine Zusammenfassung des Experimentes B1 dargestellt. Am Ende des Experimentes waren in jeweils 2 Tieren der CpG16-E7SH-Gruppe i.m. und der CpG50-E7SH-Gruppe i.t. keine Tumoren mehr tastbar. Diese Tiere wurden im Experiment C1 (siehe 4.6) für einen Re-Challenge-Experiment verwendet.



A



**Abb. 4/24: Tumor-Regressions-Experiment B1: A (i.t.) und B (i.m.):** Nach 10 Tagen waren in 40 Tieren kleine Tumoren tastbar. Am Tag 1 des Experimentes wurden die Tiere in 8 Gruppen (5 Tiere/Gruppe) aufgeteilt und immunisiert. In den Abbildungen **A** und **B** sind die immunisierten Gruppen getrennt nach der Applikationsform dargestellt. In beiden Abbildungen sind die identischen Tiere der Kontrollen (E7SH i.m. und pTHamp-Leervektor i.m.) dargestellt. Den anderen Gruppen wurde die CpG50-E7SH-DNA bzw. die CpG16-E7SH-DNA i.t. oder i.m. injiziert. Die Leervektoren CpG50 und CpG16 wurden i.t. appliziert. Am zehnten Tag erfolgte die 2. Immunisierung. Eine signifikante Tumor-Regression erzielte die E7SH-DNA-Gruppe (i.m.) und die CpG16-E7SH-DNA-Gruppe (i.m.). Das Konstrukt CpG16-Leer i.t. erreichte eine tendenziell bessere Tumor-Regression als der pTHamp-Leervektor. CpG50-DNA (+/-E7SH) zeigte keine Verbesserung der Tumor-Regression.

Tumor-Regression (Experiment B1 i.t.)	CpG16-E7SH i.t.	CpG16- Leervektor i. t.	CpG50-E7SH i.t.	CpG50- Leervektor i.t.
Durchschnittliche Tumorphäche 10 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	23,2±1,8	8,0±1,0	14±3,6	19±5,2
Durchschnittliche Tumorphäche 34 Tage nach C3-Applikation (mm <sup>2</sup> )	86,6±60,4	27,6±18,6	n. f.	59,8±49,3
Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv am Tag 34 (mm <sup>2</sup> : Anzahl der Tiere)	0-24: 1 25-49: 1 50-99: 1 100-149: 2	0-24: 3 25-49: 1 50-99: 1 100-149: 0	n.f.	0-24: 1 25-49: 1 50-99: 1 100-149: 2

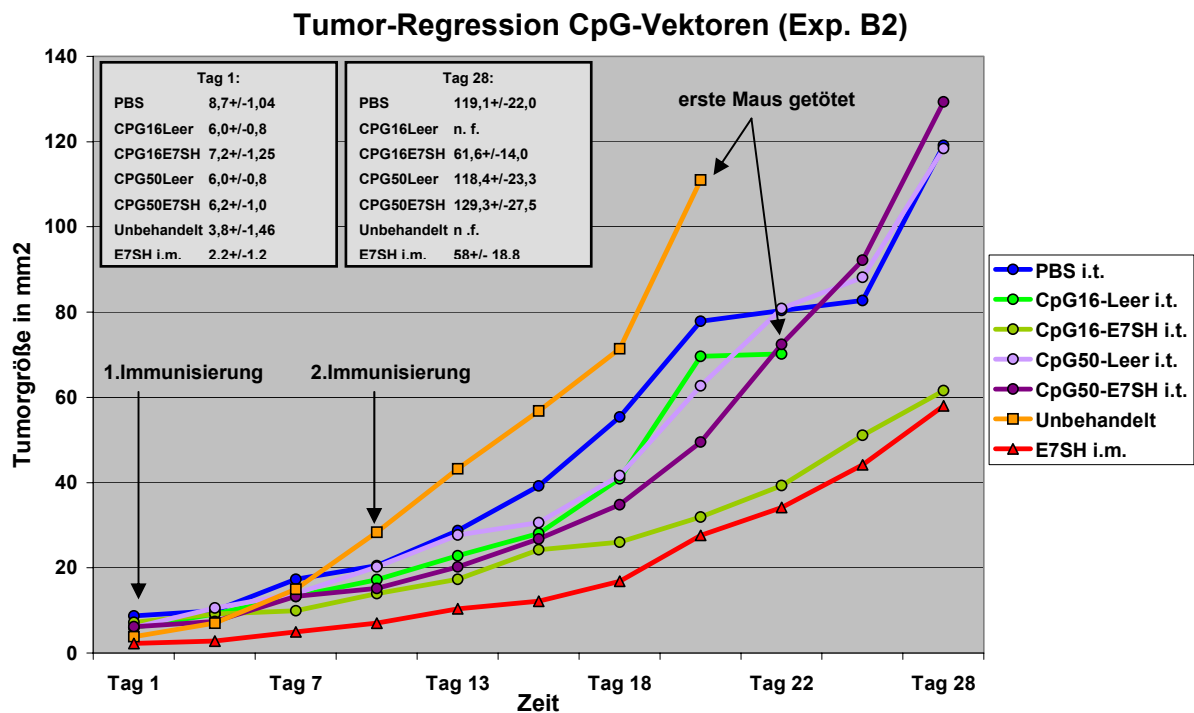
**Abb. 4/25 A: Übersichtstabelle Tumor-Regressions-Experiment B1 i.t.:** Angegeben ist die durchschnittliche Tumorphäche ± SEM in mm<sup>2</sup> sowie die Verteilung der Tumorgößen im jeweiligen Kollektiv am Tag 34. Als Kontrollen bzw. Vergleichsgruppen dienen pTHamp-Leervektor i.m. und E7SH i.m. (siehe Abb. 4/25 B).

<b>Tumor-Regression (Experiment B1 i.m.)</b>	<b>pTHamp- Leervektor i. m.</b>	<b>CpG16 E7SH i.m.</b>	<b>CpG50 E7SH i.m</b>	<b>pTHamp E7SH i.m.</b>
<b>Durchschnittliche Tumorfläche 10 Tage nach C3-Applikation (mm<sup>2</sup>)</b>	3,9±0,7	6,0±1,2	6,4±1,7	3,8±1,5
<b>Durchschnittliche Tumorfläche 34 Tage nach C3-Applikation (mm<sup>2</sup>)</b>	79,7±18,6	31,6±13,7	63,1±34,4	25,2±8,4
<b>Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv an Tag 34 (mm<sup>2</sup>: Anzahl der Tiere)</b>	0-24: 0 25-49: 2 50-99: 0 100-149: 3	0-24: 2 25-49: 2 50-99: 1 100-149: 0	0-24: 3 25-49: 0 50-99: 0 100-149: 2	0-24: 3 25-49: 2 50-99: 0 100-149: 0

**Abb. 4/25 B: Übersichtstabelle Tumor-Regressions-Experiment B1 i.m.:** Angegeben ist die durchschnittliche Tumorfläche  $\pm$  SEM in mm<sup>2</sup> sowie die Verteilung der Tumorgößen im jeweiligen Kollektiv am Tag 34.

Im **Tumor-Regressions-Experiment B2** wurden 70 Tiere mit C3-Tumorzellen behandelt (siehe 3.5.4). Nach 12 Tagen waren in allen Tieren kleine Tumore mit einem Durchmesser von 2 - 6mm tastbar, so dass immunisiert werden konnte (Tag 1). Nach der Tumorzellapplikation wurden die Tiere in 7 Gruppen (10 Tiere/ Gruppe) eingeteilt. Eine Gruppe wurde gar nicht immunisiert, so dass das normale Tumorwachstum ohne mechanische Beeinflussung beobachtet werden konnte. Als Negativ-Kontrolle und als Referenzgruppe wurde einer Gruppe PBS i.t und einer weiteren die E7SH-DNA i.m appliziert. Den restlichen 4 Gruppen wurden jeweils die Konstrukte CpG16-Leervektor, CpG50-Leervektor, CpG16-E7SH oder CpG50-E7SH intratumoral injiziert. In der Abbildung 4/26 wird der Verlauf dieses Tumor-Experimentes dargestellt. Bei den Tumoren, welche unbehandelt blieben, waren bereits am Tag 20 vier Tumoren im Durchmesser größer als 1,5cm, so dass diese ausgesondert werden mussten. Am Tag 22 mussten auch in der mit CpG16-Leervektor-immunisierten Gruppe, aufgrund offener und blutiger Bisswunden an den Tumoren, Tiere getötet werden. Am Tag 28 des Experiments zeigten die Konstrukte E7SH i.m (58  $\pm$  18,8mm<sup>2</sup>) und CpG16-E7SH i.t. (61,6  $\pm$  14,0mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Kontrolle PBS i.t. (119,1  $\pm$  22,0mm<sup>2</sup>) die stärkste Tumor-Regression. Für CpG16-E7SH i.t. errechnet sich mittels Student's t-Test eine Signifikanz (P=0,04) und für die E7SH-Gruppe eine hohe Signifikanz (P=0,007) der Tumor-Regression im Vergleich zur PBS-Gruppe. Vom CpG50-Leervektor oder dem CpG50-E7SH-Konstrukt konnte wiederum keine gesteigerte Tumor-Regression im Vergleich zur PBS-Gruppe detektiert werden. Insgesamt lässt sich aus diesem Experiment der Schluss ziehen, dass nur CpG16-E7SH intratumoral verabreicht eine ähnliche

Tumor-Regression hervorruft wie das i.m. applizierte pTHamp-E7SH-Konstrukt. Auch kann man durch den Vergleich der PBS-Gruppe (Tag 28:  $119,1 \pm 22,0 \text{ mm}^2$ ) mit der unbehandelten Gruppe (Tag 28: alle Tumoren größer als  $225 \text{ mm}^2$ ) schlussfolgern, dass auch ein mechanischer Effekt bei der intratumoralen Immunisierung einen gewissen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Tumoren ausübt. Eine Zusammenfassung des Experimentes wird in der Abbildung 4/27 dargestellt.



**Abb. 4/26: Tumor-Regressions-Experiment B2.** 12 Tage nach der Tumorzellapplikation wurden 70 Tiere in 7 Gruppen (10 Tiere/ Gruppe) aufgeteilt und immunisiert (Negativ-Kontrollen PBS und Referenzgruppe E7SH i.m.). CpG50-E7SH, CpG16-E7SH und die CpG50- und CpG-16-Leervektoren wurden i.t. appliziert. Am 10. Tag erfolgte die zweite Immunisierung. Eine signifikante Tumor-Regressionen erzielten die E7SH-DNA-Gruppe i.m. und die CpG16-E7SH-Gruppe i.t. CpG50 (+/- E7SH) zeigten keine Tumor-Regression.

<b>Tumor-Regression (Experiment B2)</b>	<b>Durchschnittliche Tumorfläche 10 Tage nach C3-Applikation (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Durchschnittliche Tumorfläche 38 Tage nach C3-Applikation (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>Verteilung der Tumorgößen im Kollektiv am Tag 38 (mm<sup>2</sup>: Anzahl der Tiere)</b>
<b>Unbehandelt (5 Tiere)</b>	3,8±1,5	n.f.	alle > 300
<b>PBS i. t.</b>	8,7±1,0	119,1±22,0	0-24: 0 25-49: 0 50-99: 1 100-149: 6 150-300: 3
<b>CpG16-Leervektor i. t.</b>	6,0±0,8	n.f.	0-24: 2 25-49: 0 50-99: 0 100-149: 3 > 300: 5
<b>CpG50-Leervektor i. t.</b>	6,0±0,8	118,4±23,3	0-24: 1 25-49: 2 50-99: 1 100-149: 2 150-300: 4
<b>CpG16-E7SH i. t.</b>	7,2±1,3	61,6±14,0	0-24: 2 25-49: 3 50-99: 4 100-149: 1 150-300: 0
<b>CpG50-E7SH i. t.</b>	6,2±1,0	129,3±27,5	0-24: 1 25-49: 4 50-99: 0 100-149: 3 150-300: 2
<b>pTHamp-E7SH i. m.</b>	3,8±1,5	25,2±8,4	0-24: 3 25-49: 4 50-99: 2 100-149: 1 150-300: 0

**Abb. 4/27: Übersichtstabelle Tumor-Regressions-Experiment B 2:** Angegeben ist die durchschnittliche Tumorfläche ± SEM in mm<sup>2</sup> sowie die Verteilung der Tumorgößen im jeweiligen Kollektiv am Tag 38.

#### 4.6 Re-Challenge mit C3-Tumorzellen

Das **Experiment C1** wurde mit Tieren aus den Experimenten A1 und B1 durchgeführt, bei denen der Tumor komplett also nicht tastbar bzw. auf 1 mm im Durchmesser regredient war. Aus dem Experiment A1 konnten 2 Tiere aus der E7SH/GM-CSF-Gruppe, ein Tier aus der E7SH/IL-2-Gruppe und ein Tier aus der E7SH-Gruppe für ein Re-Challenge-Tumor-Experiment eingesetzt werden. Am Ende des Experiments B1 (i.t.) waren jeweils aus der CpG16-E7SH-Gruppe sowie der CpG50-E7SH-Gruppe 2 Tiere ohne einen tastbaren Tumor

(siehe Abb. 4/28). Diesen 8 Tieren wurden erneut C3-Tumorzellen injiziert. Die erneute Injektion der Tumorzellen erfolgte in diesem Re-Challenge-Tumor-Experiment in die linke, bisher unbehandelte, Flanke der Tiere. Die Injektion der C3-Tumorzellen erfolgte 95 Tage nach der ersten C3-Tumorzellapplikation. Als Kontrollgruppe wurden einer Gruppe von 5 bisher komplett unbehandelten Tieren ebenfalls C3-Tumorzellen appliziert. Bei den Tieren der Kontrollgruppe entwickelten sich bereits nach 5 Tagen tastbare Tumoren. Die Tiere der Kontroll-Gruppe mussten nach 20 Tagen entsorgt werden, da die Tumoren eine Größe von  $225\text{mm}^2$  erreicht hatten. Die 8 Tiere der Re-Challenge-Gruppe wurden 40 Tage lang beobachtet. In diesem Zeitrahmen konnte in keinem der Tiere ein erneutes Tumorwachstum festgestellt werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei den Tieren, bei denen der Tumor regredient war auch eine zweite C3-Zellapplikation zu keinem Tumorwachstum führte.

	Re-Challenge	Durchschnittliche Tumorfläche am Ende von A1 (Tag38) bzw. B1 (Tag28)	Durchschnittliche Tumorfläche Beginn Re-Challenge (Tag 95)	Durchschnittliche Tumorfläche Ende Re-Challenge (Tag 135)
A1	2 Tiere aus der E7SH/GM-CSF-Gruppe	$0,25\text{mm}^2$ $1\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$
	1 Tier aus der E7SH/IL-2-Gruppe	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$
	1 Tier aus der E7SH-Gruppe	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$
B1	2 Tiere aus der CpG16-E7SH-Gruppe	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$
	2 Tiere aus der CpG50-E7SH-Gruppe	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$	$0\text{mm}^2$
	5 unbehandelte Kontrolltiere	-	$0\text{mm}^2$	$>225\text{mm}^2$

**Abb. 4/28: Übersichtstabelle Re-Challenge-Tumor-Experiment:** Alle Tiere aus A1 und B1, bei denen der Tumor komplett regredient war, zeigten auch im Re-Challenge kein Tumorwachstum. Die Kontrolltiere zeigten sehr starkes Tumorwachstum.

## 5. Diskussion

Zervixkarzinome stehen in engem kausalem Zusammenhang mit den HR-HPV Typen. Vor allem die HPV-Typen 16, 18, 33 und 45 wurden in schwergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN III) sowie dem Zervixkarzinom detektiert (Jacobs et al. 1997, Bosch et al. 1995, de Villiers 1994). Etwa 71% dieser Karzinome sind mit den HPV-Typen 16 oder 18 assoziiert (Munoz et al. 2004). Dabei exprimieren sowohl die Tumorzellen, als auch deren Vorläuferzellen permanent die viralen Onkogene E6 und E7 (Schneider et al. 2001). Eine Vakzine, welche eine zelluläre Immunantwort gegen die E6- und E7-Antigene der beiden HR-HPV-Typen 16 und 18 vermittelt, könnte für die adjuvante Behandlung in 70% aller Zervixkarzinome von großer Bedeutung sein. Ziel unserer Arbeitsgruppe ist die Entwicklung einer multivalenten therapeutischen DNA-Vakzine, welche artifizielle Versionen der Gene HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 und HPV18-E7 enthält. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den E6- und E7-Genen der HR-HPV-Typen um Onkogene handelt, ist es ethisch nicht vertretbar, diese im humanen Bereich im Rahmen einer Immunisierung zu applizieren. Deshalb wurde in einer „Proof-of-Principle“-Studie ein artifizielles HPV16-E7 Gen (HPV16-E7SH) generiert, welches seine transformierenden Eigenschaften verloren hat, jedoch im murinen Modell eine gegen das HPV16-E7 Wildtyp-Gen gerichtete zelluläre Immunantwort induziert. Das HPV16-E7SH wurde so generiert, dass alle potentiellen natürlichen CTL-Epitope erhalten blieben (Osen et al. 2001, Dissertation Öhlschläger, P. 2003, Öhlschläger et al. 2006). Für eine durch das Immunsystem hervorgerufene Regression einer etablierten Tumormasse ist eine effiziente Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten essentiell. Um die Effizienz einer DNA-Vakzine zu steigern, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Adjuvantien (genkodierte Zytokine, CpG-Motive, Kardiotoxin) zusammen mit dem immunologisch gut charakterisierten HPV16-E7SH-Gen ko-appliziert.

### 5.1 Potentielle Adjuvantien für die Entwicklung einer multivalenten DNA-Vakzine

Um die Immunogenität der Vakzine zu steigern wurde vor das E7SH-Gen die Kozak-Sequenz eingefügt, welche zu einer Steigerung der Translation führt (Kozak 1991). Steinberg et al. (2005) zeigten, dass mittels Kozak-Sequenz eine 20-fach stärkere Expression des HPV16-E7 Gens erzielt werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, eine weitere Steigerung der HPV16-E7SH-DNA-Vakzine zu erzielen. Als mögliche adjuvante Gene wurden die Zytokine GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 ausgewählt. Eine Gemeinsamkeit dieser drei adjuvanten Gene ist die



bevorzugte Beeinflussung der TH<sub>1</sub>-Immunantwort. Für GM-CSF konnte gezeigt werden, dass es die Immunantwort über Proliferation, Reifung und Migration der Dendritischen Zellen steigert sowie die Expansion und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten fördert (Perales et al. 2002). Das Interleukin 2 ist ein durch T-Zellen produziertes Lymphokin, welches als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor die T-Zell-Proliferation unterstützt (Grande et al. 2006). Des Weiteren werden durch IL-2 NK-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. Auch Interferon- $\gamma$  spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort gegen Infektionen. Es wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  ein sehr starker Aktivator der TH<sub>1</sub>-Immunantwort ist (Tsai et al. 2003). IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen (Boehm et al. 1997) und führt zu einer Hochregulierung der MHC-Klasse I und II Expression (Lu et al. 2002). Jedes dieser Zytokine wurde bereits in verschiedenen Studien auf seine potentielle adjuvante Wirkung hin untersucht (Scheerlinck 2001, Kusakabe et al. 2000, Chow et al. 1998). Hierbei zeigten sich für die adjuvanten Gene (GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2) unterschiedliche Ergebnisse, so dass in dieser Arbeit die adjuvante Wirkung am Modell-Antigen E7SH überprüft werden sollte.

Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung einer DNA-Vakzine zu verbessern, stellt die Modifikation des verwendeten Plasmides dar. Bisher wurde in den E7SH-Immunisierungsexperimenten der Vektor pTHamp verwendet. Ein Grund für den bisherigen Einsatz dieses Vektors ist das Vorhandensein von immunostimulatorischen CpG-Motiven. Diese Motive sind in der Lage, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen zur Proliferation und Reifung sowie daraufhin zur Sekretion bestimmter Zytokine und Chemokine anzuregen (Krieg et al 2001). Sato et al. (1996) zeigten, dass CpG-Motive für die Erzielung einer Immunantwort durch einen DNA-Impfstoff einen entscheidenden Vorteil darstellen. Daraufhin wurde in mehreren Studien der Einsatz dieser CpG-Motive als Adjuvants zur DNA-Immunisierung überprüft. Hierbei zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse. Kojima et al. (2002) zeigten am Modell eines HIV-1 DNA-Impfstoffes, dass die Ko-Applikation von CpG-Plasmiden, speziell 2 oder 4 Tage nach der DNA-Immunisierung, zu einer signifikanten Steigerung der HIV-spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort führt. Die effektivste Steigerung der Immunantwort wurde mit den Plasmiden erzielt, welche 20 CpG-Motive enthielten. Hingegen konnten Deml et al. (2001) ebenfalls an einem HIV-1 Gag (Group specific antigen) DNA-Vektor-System keine signifikante Steigerung der Immunantwort bei Ko-Applizierung von CpG-Motiven nachweisen.

Im pTHamp-Vektor wurden vier dieser „optimal aktivierenden“ CpG-Sequenzen gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurden im Vergleich zum pTHamp-Vektor (4 CpG-Motive) zwei verschiedene CpG-Vektoren eingesetzt (16 bzw. 50 CpG-Motive).

## 5.2 Sicherheit der DNA-Vakzine und Anwendung in humanen Studien

Ein weiterer Grund für den Einsatz der CpG-Vektoren im Vergleich zum pTHamp-Vektor ist die Sicherheit der DNA-Vakzine. Der pTHamp-Vektor enthält ein Ampizillin-Resistenzgen, welches die Amplifikation des Plasmids im Labor stark vereinfacht. Bei der DNA-Präparation können jedoch kleinste Mengen des  $\beta$ -Laktam-Antibiotikums zurückbleiben. Aufgrund der Tatsache, dass viele Menschen allergisch auf dieses Antibiotikum reagieren und damit bei jeder Immunisierung die Möglichkeit eines tödlich verlaufenden anaphylaktischen Schocks besteht (Williams et al. 1998), ist diese Plasmid-DNA, welche durch Ampizillin-Selektion gewonnen wird, nicht für die Immunisierung am Menschen zugelassen. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass nach einer *in vivo* Vakzinierung das Ampizillin-Resistenzgen durch Gentransfer in Bakterien aufgenommen werden kann. Diese Bakterien wären dann gegen diese wichtige Antibiotikagruppe unempfindlich (Williams et al. 1998).

Der Vorteil des CpG-Vektors ist das Fehlen dieses Ampizillin-Resistenzgens. Außerdem sind CpG-Vektoren für die Applikation am Menschen zugelassen, so dass sie für weiterführende Experimente am Menschen verwendet werden können. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass sich die Ergebnisse aus den murinen Tumorexperimenten im HPV-Kontext nur teilweise auf den Menschen projizieren lassen (van der Burg et al. 2002, Calarota et al. 1998). Im Menschen wird das Tumorwachstum durch eine persistierende virale Infektion induziert, hingegen im Tiermodell durch die subkutane Injektion tumorigener Transfektanten-Zellen, welche das gewünschte Antigen präsentieren und syngen zum Wirt sind. Ein weiterer Unterschied besteht in der Lage des Tumors zur Basallamina. Ein durch Injektion hervorgerufener Tumor befindet sich unterhalb der Basallamina und ist somit durch das Immunsystem gut zu erreichen. Hingegen durchbricht ein benignes HPV-infiziertes Gewebe in der Regel nicht die Basallamina und ist somit den Immunzellen nur sehr schwer zugänglich (Knowles et al. 1996). Dies könnte die Ursache für eine weniger erfolgreiche therapeutische Vakzinierung bei Patienten mit benignen zervikalen Dysplasien sein, da hier eine intakte Basallamina besteht. Allerdings wird vermutet, dass eine gewisse Immunzellinfiltration auch durch die intakte Basallamina hindurch möglich ist, denn Coleman et al. (1994) konnten auch im benignen Warzengewebe Makrophagen und Lymphozyten detektieren. Des Weiteren konnten Podack und Kupfer (1991) die lokale Sekretion von Zytokinen durch CD-4 T-Helferzellen zeigen, die in der Lage sind durch die Basallamina zu diffundieren und möglicherweise dadurch die Proliferation der HPV-infizierten Zellen zu hemmen (Street und Mosmann 1991).

### 5.3 Expressionsnachweis der adjuvanten Gene IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$

Um die Expression der in der vorliegenden Arbeit generierten Plasmide zu überprüfen, wurden die Genkonstrukte pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$  und pTHamp-IL-2 durch Transfektion in RMA-Zellen eingeschleust. Diese Zellen sind syngen zu den im Rahmen der Immunisierungsexperimente verwendeten Mäusen. Der Nachweis der Transkription der adjuvanten Gene mittels Northern Blot-Analyse und RT-PCR war bei allen drei adjuvanten Genen positiv. Mittels Western-Blot-Analyse wurde das extrahierte Gesamtprotein auf die Proteinexpression des jeweiligen adjuvanten Gens hin untersucht. Hierbei konnte die Expression des adjuvanten Gens GM-CSF nachgewiesen werden. Hingegen zeigten sich bei IFN- $\gamma$  und IL-2 im Western Blot negative Ergebnisse. Es konnte zwar bei beiden Konstrukten eine Bande auf der richtigen Höhe detektiert werden, aber es zeigten sich jeweils auch in der Negativkontrolle Banden auf dieser Höhe, so dass man nicht schlussfolgern kann, dass das jeweilige adjuvante Gen in den Zellen exprimiert wird. Die schwachen Banden auf der entsprechenden Höhe lassen sich mit der geringen Halbwertszeit der Zytokine begründen, so dass vermutlich zu wenig Protein vorhanden war, um in diesen Assays detektiert werden zu können. Der Einsatz des Golgi-Stopps am Ende der Transfektion hätte zu einer Akkumulation von Protein und somit vermutlich zu einer im Western Blot stärker zu detektierenden Bande führen können. Aufgrund der für alle Konstrukte positiven RT-PCR und der Northern Blots und der somit dargestellten Transkription wurden die Konstrukte pTHamp-GM-CSF, pTHamp-IFN- $\gamma$  und pTHamp-IL-2 anschließend für Tumorexperimente in Ko-Applikationen mit der E7SH-DNA zur Steigerung der Immunantwort eingesetzt.

### 5.4 Immunologische Vorteile der Anwendung des DNA-Adjuvants Kardiotoxin

Das als DNA-Adjuvants eingesetzte Kardiotoxin wird aus der malaysischen Schlange *Naja nigricollis* gewonnen. Es führt nach intramuskulärer Injektion zu einem inflammatorischen Prozess im Muskelgewebe (Davis et al. 1993 und 1995), welcher am 5. - 10. Tag seinen Höhepunkt erreicht. Aufgrund der somit induzierten Entzündung kommt es zu einer Rekrutierung diverser Immunzellen. Die eingewanderten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen sollen eine verstärkte Präsentation von nach einer DNA-Immunisierung exprimierten Antigenen ermöglichen (Davis et al. 1993). Bisher wurden bei murinen Experimenten standardmäßig alle Tiere mit dem Adjuvants Kardiotoxin vorbehandelt (Rosato et al. 2003, Arulkanthan et al. 1999). Da dieses Adjuvants aufgrund

seiner kardiotoxischen Wirkung jedoch nicht für eine Immunisierung am Menschen zugelassen ist, sollte die Notwendigkeit der Vorbehandlung mit Kardiotoxin in dieser Arbeit erneut verifiziert werden. In bisherigen Experimenten mit dem E7SH konnte gezeigt werden, dass die Kardiotoxin-Vorbehandlung keine immunologischen Vorteile brachte (Prof. P. Öhlschläger, persönliche Mitteilung). Auch Fomsgaard (1999) konnte durch die Vorbehandlung mit Kardiotoxin keinen immunologischen Nutzen im Zusammenhang mit einer DNA-Vakzine darstellen. Die Erzielung einer Immunantwort ohne diese Vorbehandlung wäre ein wichtiger Schritt für die Zulassung eines humanen DNA-Impfstoffes. Jedoch konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsexperimenten (Exp. A, siehe 4.4.3) lediglich mit Kardiotoxin eine E7SH-spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nachgewiesen werden. Da in einem weiteren Experiment unserer Arbeitsgruppe ein gleiches Ergebnis erzielt wurde (Mandy Pierau, persönliche Mitteilung), konnten die Ergebnisse von Prof. P. Öhlschläger in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Daraufhin wurde in allen weiteren Experimenten dieser Arbeit den Tieren das Adjuvants Kardiotoxin jeweils 5 Tage vor der DNA-Immunisierung appliziert, obwohl es für die Anwendung am Menschen obsolet ist. Es gibt allerdings weitere Substanzen, welche für die Anwendung am Menschen zugelassen sind und ähnliche Effekte wie Kardiotoxin hervorrufen. Zum Beispiel zeigten Danko et al. (1994) in einem Vergleich verschiedener Stoffe zur Vorbehandlung einer DNA-Immunisierung, dass 0,75% Bupivacain eine sehr gute adjuvante Wirkung hervorrufen kann. In einer anderen Studie wurden die adjuvanten Wirkungen von Kardiotoxin und Bupivacain als Vorbehandlung einer DNA-Immunisierung in einem Mausmodell verglichen. Hier konnten Rosato et al. (2003) zeigen, dass sowohl Kardiotoxin als auch Bupivacain in der Lage sind, die Zahl an infiltrierten aktiven Immunzellen und die Expression von Zytokinen und Chemokinen stark zu erhöhen. Für Bupivacain konnte im Vergleich zum Kardiotoxin eine leicht, aber nicht signifikant geringere Immunantwortsteigerung dokumentiert werden. Der Vorteil des Bupivacain liegt in der Zulassung für humane Experimente. Um die Wirkung des Bupivacain am E7SH-Modell zu untersuchen, sollten Immunisierungsexperimente durchgeführt werden, in denen an Stelle des Kardiotoxin Bupivacain appliziert wird.

### **5.5 Von den ko-applizierten adjuvanten Genen ist nur IL-2 in der Lage, eine Steigerung der Immunantwort hervorzurufen**

In drei unabhängig voneinander durchgeführten Immunisierungsexperimenten (Exp. B, C und D) wurde mittels IFN- $\gamma$  Elispot-Assay die spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion des E7SH bei Ko-Applikation der adjuvanten Gene (GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2) untersucht. Es konnte gezeigt

werden, dass von den injizierten adjuvanten Genen lediglich IL-2 in der Lage ist, die Immunantwort der E7SH-DNA, gemessen als IFN- $\gamma$ -Sekretion *in vitro* restimulierter Milzzellen, zu steigern. In den Elispot-Experimenten wurde durch die zusätzliche Immunisierung mit dem adjuvanten Gen IL-2 vor allem *ex vivo* und nach der 1. Restimulierung eine stärkere IFN- $\gamma$ -Sekretion hervorgerufen als bei der E7SH-Gruppe. Bei der 2., 3. und 4. Restimulierung kam es zu einer Angleichung der E7SH induzierten und der E7SH/IL-2 induzierten spezifischen Immunantwort. Eine Ursache für diese Angleichung könnte in einer unterschiedlich guten *in vitro* Restimulierung von verschiedenen T-Zell-Klonen liegen. Diese wäre z.B. durch schleichende Infektionen der Zell-Kulturen denkbar. Generell ist durch *in vitro* Restimulierungen mit Artefakten zu rechnen. Eine *ex vivo* durchgeführte Quantifizierung der zellulären Immunantwort besitzt demnach den größten Aussagewert. Für die adjuvanten Gene GM-CSF und IFN- $\gamma$  konnte in den durchgeführten Elispot-Experimenten - wider Erwarten - keine gesteigerte IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur E7SH-Gruppe gezeigt werden. Entweder konnte bei diesen beiden adjuvanten Genen eine dem E7SH-Konstrukt gleiche oder in einigen Fällen auch eine schlechtere IFN- $\gamma$ -Sekretion detektiert werden.

In früheren Studien wurden diesbezüglich ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. Von Mehren et al. (2001) zeigten, dass GM-CSF als ein Adjuvans des ALVAC-CEA B7.1 Protein-Impfstoffes gegen CEA (carcinoembryonic antigen) Tumoren keine Steigerung der Immunantwort hervorrufen konnte. Im Gegensatz dazu zeigten Marshall et al. (2000) mit dem gleichen Impfstoff ALVAC-CEA bei Patienten mit CEA-exprimierenden Kolon-Karzinomen, dass die Ko-Applikation von GM-CSF zu einer gesteigerten T-Zell-Immunantwort führt. Auch in den Veröffentlichungen von Disis et al. (2003), Sun et al. (2002) und Kwissa et al. (2003) wurde dargestellt, dass GM-CSF als Adjuvans eines DNA-Impfstoffes in der Lage ist, die bei einer Tumorbehandlung wichtige zelluläre Immunantwort zu verbessern. Yoon et al. (2006) zeigten, dass die Ko-Applikation von GM-CSF zu einem DNA-Impfstoff gegen den Pseudorabies Virus die humorale und zelluläre Immunantwort steigert. GM-CSF wird momentan bereits in einigen klinischen Studien als Adjuvans für Impfstoffe eingesetzt. In der Phase-1-Studie eines DNA-Impfstoffes (pVAX/PSA) gegen das Prostata spezifische Antigen (PSA) konnte mit den Adjuvantien GM-CSF und IL-2 eine gesteigerte PSA-spezifische zelluläre Immunantwort erzielt werden (Pavlenko et al. 2004). Über die immunologischen Eigenschaften des adjuvanten Gens IFN- $\gamma$  konnten Kim et al. (2000 und 2001) zeigen, dass IFN- $\gamma$  und IL-2 sehr starke Modulatoren der T-Zell-Immunantwort darstellen. Hingegen zeigten Xiang et al. (1995), dass die Ko-

Applikation des Genes IFN- $\gamma$  zu einem Plasmid, welches das Glykoprotein des Rabies virus enthielt, zu einer verminderten Immunantwort führte. Im gleichen Experiment konnte eine Steigerung der Immunantwort durch das adjuvante Gen GM-CSF erzielt werden.

Mittels  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assays konnte für keines der adjuvanten Gene eine spezifische Lyse nachgewiesen werden, da bereits die Kontrollen eine starke Lyse zeigten (*in vitro* Priming) und somit von einer Auswertung abgesehen werden musste.

Eine mögliche Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit unterschiedlichen Wirkungen der einzelnen adjuvanten Gene könnte in der unterschiedlichen Qualität der eingesetzten DNA begründet sein. Um die konstante Qualität einer DNA zu garantieren, sollte diese unter standardisierten Bedingungen hergestellt werden (sogenanntes Research Grade, [www.plasmidfactory.com](http://www.plasmidfactory.com)). Bei diesem Verfahren wird der Gehalt an superhelikaler DNA (supercoiled) sowie die Reinheit der DNA kontrolliert und standardisiert. Im Rahmen der Arbeit konnte dies aber aus praktischen Gründen nicht umgesetzt werden. Für die verschiedenen Immunisierungsexperimente wurde DNA aus mehreren DNA-Präparationen eingesetzt, so dass ein direkter Vergleich zum Teil erschwert ist. Bei einer DNA-Präparation liegt die DNA normalerweise in verschiedenen Topologien vor (ccc-supercoiled DNA, offene zirkuläre Form und offene lineare Form). Für eine erfolgreiche Transfektion von Zellen nach intramuskulärer DNA-Applikation ist die kovalent geschlossene zirkuläre (cccDNA) Form für einen effizienten Gentransfer notwendig (Prazeres et al. 1999, Walther et al. 2003). Um Experimente exakt miteinander vergleichen zu können, sollten diese Parameter (Reinheit und DNA-Form) innerhalb dieser Experimente identisch sein. Eine weitere Tatsache, die man bei DNA-Immunisierungsexperimenten beachten muss, betrifft die Stabilität der eingesetzten DNA. Untersuchungen haben gezeigt, dass die DNA bei Langzeit-Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zu 13 Monate stabil bleibt. Hingegen zeigten sich bereits bei  $+4^{\circ}\text{C}$  starke Veränderungen in der DNA-Topologie. Die DNA für die Immunisierungen in dieser Arbeit wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Eigene Beobachtungen zeigten, dass es durch häufiges Öffnen der Gefrierschranktüren zu einem zeitweiligen Temperaturanstieg auf ca.  $-5^{\circ}\text{C}$  gekommen ist. Durch diesen Temperaturanstieg oder durch eventuelle Kontamination mit Nukleasen kann es zu einer Änderung in der Topologie der DNA von der supercoiled-DNA-Form in die offene zirkuläre oder offene lineare DNA-Form kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA direkt nach der DNA-Plasmid-Präparation, nicht jedoch unmittelbar vor der Immunisierung, im analytischen Agarosegel überprüft. Es könnte also sein, dass unterschiedliche DNA-Topologien zu unterschiedlichen Ergebnissen in den DNA-Immunisierungsexperimenten geführt haben. Ein weiterer Grund, warum GM-CSF und IFN- $\gamma$  in dieser Arbeit nicht zu der

erwarteten Steigerung der zellulären Immunantwort geführt haben, könnte am falschen Applikationszeitpunkt liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine simultane Immunisierung durchgeführt. Kusakabe et al. (2000) zeigten, dass der Applikationszeitpunkt des adjuvanten Genes GM-CSF die Immunantwort in eine bestimmte Richtung lenkt. Bei der Injektion des GM-CSF drei Tage vor der eigentlichen DNA-Immunisierung konnte eine gesteigerte TH<sub>2</sub>-Immunantwort detektiert werden. Hingegen wurde bei der simultanen Applikation sowohl eine gesteigerte TH<sub>1</sub>- als auch TH<sub>2</sub>-Immunantwort und bei der Applikation des adjuvanten Genes drei Tage nach der DNA-Applikation eine verbesserte TH<sub>1</sub>-Antwort beobachtet.

Auch bezüglich der adjuvanten Wirkungen des IL-2 wurden unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht. Cai et al. (2005) zeigten, dass die Ko-Applikation von IL-2-Plasmid-DNA mit einem DNA-Impfstoff gegen *Mycobacterium tuberculosis* zu einer gesteigerten TH<sub>1</sub>-Zell-Immunantwort bei Mäusen führt. Sie wiesen in mehreren Experimenten nach, dass durch die Ko-Applikation des adjuvanten Gens IL-2 zu einem kombinierten DNA Impfstoff gegen drei Antigene (Ag85B, MPT64 und MPT83) des *Mycobacterium tuberculosis* eine jeweils 1,6-, 1,8-, und 2,5-fach stärkere spezifische Sekretion von IFN- $\gamma$  erreicht werden kann, als durch den DNA-Impfstoff alleine. Außerdem wurde in den IL-2-Gruppen eine wesentlich geringere Zerstörung des Lungengewebes nachgewiesen. Mittels RT-PCR konnten sie belegen, dass bei IL-2 immunisierten Tieren die Antigene wesentlich länger und in wesentlich mehr Organen vorhanden sind, als bei den Kontrollgruppen, welche nur mit dem DNA-Impfstoff behandelt wurden. Somit konnte bestätigt werden, dass IL-2 eine verlängerte Antigen-Expression in verschiedenen Organen unterstützt (Cai et al. 2005). An einem DNA-Impfstoff gegen Pseudorabies Virus IE180 wurden ebenfalls die adjuvanten Effekte des IL-2 untersucht (Bu et al. 2003). Auch hier konnte durch die Ko-Applikation des IL-2 eine Steigerung der durch einen DNA-Impfstoff hervorgerufenen Immunantwort gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche, die Immunantwort steigernde, Ergebnisse erzielt werden, wie von Cai et al. (2005) und Bu et al. (2003) veröffentlicht. Durch die Ko-Applikation des Adjuvants IL-2 mit dem DNA-Impfstoff E7SH konnte eine Steigerung der E7-spezifischen IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zur Immunisierung mit dem E7SH alleine erzielt werden.

## 5.6 Von den eingesetzten adjuvanten Genen ist *in vivo* nur IL-2 in der Lage, eine gesteigerte Immunantwort zu vermitteln

Um die Bedeutung der *in vitro*-Quantifizierung der zellulären Immunantwort mittels IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay *in vivo* zu verifizieren, wurden zwei unabhängige Tumor-Experimente durchgeführt. In dieser Arbeit wurden Tumor-Regressions-Experimente durchgeführt, welche im Vergleich zu Tumor-Protektions-Experimenten den Vorteil aufweisen, dass eine bereits bestehende Tumormasse von den induzierten Immunzellen (CTLs, T-Helfer-Zellen) infiltriert werden muss, um eine Regression zu erzielen (Marzo et al. 2000). Dies kommt dem natürlichen Ablauf einer therapeutischen Vakzinierung im Menschen am Nächsten.

Den Versuchstieren wurden hierzu HPV16-E7-exprimierende C3-Tumorzellen subkutan appliziert. Anschließend erfolgte die intramuskuläre DNA-Immunisierung. Der Mechanismus der Immunantwort nach i.m. DNA-Applikationen ist noch nicht vollständig bekannt. Die i.m. Applikation führt zu einer niedrigen Transfektionsrate von Myozyten (Wolff et al. 1992). Diese sind nicht in der Lage, MHC-II und ko-stimulatorische Moleküle zu exprimieren, sondern lediglich wenige MHC-I-Moleküle. Sie besitzen somit nicht die Möglichkeit, eine direkte CTL-Antwort zu induzieren. Untersuchungen zeigten, dass das Priming von CTLs nach i.m. Immunisierungen durch direkte Transfektion von APCs (Dendritischen Zellen) induziert wird (Corr et al. 1996, Doe et al. 1996). Eine weitere Möglichkeit der CTL-Induktion stellt die Übertragung des Antigens vom Myozyten auf die APCs dar. Dies wird durch den sogenannten „Cross-Priming-Mechanismus“ ausgelöst (Cho et al. 2001). Die APCs können zwei Arten der Immunantwort auslösen: die TH<sub>1</sub>-oder TH<sub>2</sub>-Antwort. Für die Bekämpfung eines viralen Infektes bzw. eines Tumorantigens spielt vor allem die TH<sub>1</sub>-Antwort eine entscheidende Rolle. Ausschlaggebend für die Differenzierung der TH<sub>0</sub>-Zellen in TH<sub>1</sub>- oder TH<sub>2</sub>-Zellen ist ein bestimmtes Zytokinmilieu. Als starke Aktivatoren der TH<sub>1</sub>-Immunantwort gelten die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine IL-2, GM-CSF und IFN- $\gamma$  (Kim et al. 2000). In beiden Tumor-Regressions-Experimenten wurden nach der i.m. DNA-Immunisierung ähnliche Ergebnisse beobachtet. Im Experiment A1 konnte durch die E7SH-Gruppe eine signifikante ( $P=0,04$ ) Tumor-Regression im Vergleich zur Kontrollgruppe pTHamp erzielt werden. Ein noch geringeres und im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikantes ( $P=0,005$ ) Tumorwachstum konnte durch die E7SH/IL-2-immunisierte Gruppe erreicht werden. Auch der Mittelwert der Tumorgrößen am 38. Tag des Experimentes zeigte eine deutlich bessere Tumor-Regression in der E7SH/IL-2-Gruppe ( $69,8 \pm 16,3 \text{ mm}^2$ ) im Vergleich zur E7SH-Gruppe ( $100,3 \pm 30,4 \text{ mm}^2$ ). Im Experiment A2 erzielte ebenfalls die E7SH/IL-2-Gruppe ein tendenziell ( $P=0,08$ ) geringeres Tumorwachstum als die



Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Tumorgrößen lag am 25. Tag des Experimentes in der E7SH/IL-2-Gruppe ( $28,4 \pm 7,8\text{mm}^2$ ) deutlich unter dem Mittelwert der E7SH-Gruppe ( $48,2 \pm 5,5\text{mm}^2$ ). Die Untersuchungen von Sin et al. (1999) zeigten ähnliche Ergebnisse. An Hand eines Tumor-Protektions-Experimentes in einem Herpes simplex virus Typ 2 Maus-Modell konnten Sin et al. durch die Ko-Applikation des adjuvanten Genes IL-2 eine gesteigerte Tumor-Protektion erzielen.

In den Gruppen E7SH/GM-CSF und E7SH/IFN- $\gamma$  konnte im Vergleich zur E7SH-Gruppe, in keinem der beiden Tumor-Regressions-Experimente ein vermindertes Tumorwachstum festgestellt werden. Bei beiden adjuvanten Genen mussten in einem Experiment frühzeitig Tiere getötet werden, da die Tumore bereits größer als  $225\text{mm}^2$  waren bzw. sich blutige Tumorkläsionen ausbildeten.

Obwohl im  $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungs-Assay keine spezifische Lyse gezeigt werden konnte, lässt sich mit den Ergebnissen aus den Tumor-Regressions-Experimenten durch die Gruppen E7SH und E7SH/IL-2 indirekt eine solche nachweisen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den adjuvanten Genen GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 nur IL-2 in der Lage ist, eine deutliche Steigerung der durch das E7SH hervorgerufenen Immunantwort zu induzieren.

### **5.7 Von den eingesetzten Vektoren ist der Vektor CpG16 in der Lage, eine Steigerung der Immunantwort hervorzurufen**

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Immunisierungsexperimenten (Exp. E und F) zeigte sich, dass - im Vergleich der eingesetzten Immunisierungsvektoren (pTHamp-E7SH vs CpG16-E7SH vs CpG50-E7SH) - mit dem CpG16-Vektor die stärkste Induktion der zellulären Immunantwort erzielt werden kann (IFN- $\gamma$ -Elispot-Assay). Bei der Applikation der Leervektoren (pTHamp, CpG16, CpG50) konnte sowohl durch den CpG16- als auch durch den CpG50-Vektor eine verstärkte IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zum pTHamp-Leervektor detektiert werden. Diese E7-spezifische Immunantwort lässt sich vermutlich durch die unspezifische Stimulierung des Immunsystems durch CpG-Motive erklären. Somit ist es möglich, dass bei Zugabe des E7-Peptids im Elispot-Assay unter Umständen alle Tiere, welche mit CpG-Motiven immunisiert wurden, positiv mit einer IFN- $\gamma$  Sekretion reagieren. Hierbei ist es unerheblich, mit welchem Peptid die Zellen im Elispot-Assay behandelt wurden, da die CpG-Motive eine unspezifische Immunantwort induzieren und es somit vermutlich auch bei nicht HPV-16 E7-Peptiden zu einer IFN- $\gamma$ -Sekretion kommen kann.

In verschiedenen Arbeiten wurde die unspezifische immunstimulierende Wirkung von CpG-Motiven bzw. CpG-DNA beschrieben (Krieg und Davis 2005, Liu et al. 2005, Krieg 2002). CpG-DNA existiert in unterschiedlicher Häufigkeit in Prokaryonten- und Vertebraten-DNA. In bakterieller und viraler DNA finden sie sich in einer Frequenz von 1:16. Im Gegensatz dazu liegt die Frequenz bei Vertebraten-DNA lediglich bei 1:60. Ein weiterer Unterschied besteht in der Methylierung. Vertebraten-DNA ist zu über 80% am Cytosin methyliert (Bird 1987), während sich in prokaryontischer DNA keine Methylierungen finden. Durch diese Methylierungen wird die immunostimulatorische Wirkung von CpG-Motiven reduziert. Anhand dieser Unterschiede in der DNA von Vertebraten und Prokaryonten hat das vertebrale Immunsystem die Möglichkeit, prokaryontische DNA, welche unmethylierte CpG-Motive enthält, als fremd und somit als Gefahrensignal zu erkennen. Insgesamt existieren immunstimulierende CpG-Motive ca. 20mal häufiger in bakterieller und viraler DNA als in DNA höherer Vertebraten. Um diese Wirkung der bakteriellen/ viralen DNA auf das Immunsystem zu immitieren wurden synthetische Oligodesoxynucleotide (ODNs) hergestellt, welche diese unmethylierten CpG-Motive enthalten und somit auf das Immunsystem als Gefahrensignal wirken (Hertoghs et al. 2003). Es wurden bisher 3 Hauptfamilien der CpG-ODNs mit verschiedenen strukturellen und biologischen Eigenschaften identifiziert. Die A-Klasse-CpGs sind starke Aktivatoren von NK-Zellen und der IFN- $\alpha$ -Sekretion durch DCs. Sie besitzen aber nur eine schwache Wirkung auf die Stimulation von B-Zellen. Im Gegensatz dazu bewirken B-Klasse-CpGs vor allem eine starke B-Zell-Aktivierung und nur eine schwache NK-Zellen- und IFN- $\alpha$ -Stimulation. Beide Klassen induzieren die Bildung von TH<sub>1</sub>-typischen Zytokinen (Krieg und Davis 2005). Als dritte Klasse wurden die C-CpGs beschrieben, welche die Eigenschaften der Klasse A- und B-CpGs vereinen (Vollmer et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden CpGs aus der Gruppe der A-CpGs eingesetzt, welche bisher am Besten untersucht worden sind.

Zwischen Mäusen und Menschen gibt es einige Unterschiede bezüglich der „optimal aktivierenden“ immunostimulatorischen CpG-Motive. Für das murine System wurde das 5'GACGTT 3' (Krieg et al. 1995, Yi et al. 1998, Rankin et al. 2001) und für das humane System das 5'GTCGTT 3' (Hartmann et al. 2000) als „optimal aktivierende“ CpG-Sequenz identifiziert.

Yamamoto et al. (1992) konnten zeigen, dass CpG-Motive speziell NK-Zellen anregen, IFN- $\gamma$  zu sezernieren. Dieses sezernierte IFN- $\gamma$  verstärkt die MHC-Expression anderer Zellen und führt somit zu einem verbesserten Ansprechen der entsprechenden Zielzellen durch aktivierte CTLs. Des Weiteren haben CpG-Motive die Eigenschaft, professionelle APCs zur Induktion

von TH<sub>1</sub>-Zytokinen zu stimulieren (Klinman et al. 1996, Stacey et al. 1996, Jakob et al. 1998). Dadurch wird eher der zelluläre Teil des Immunsystems aktiviert, welcher aufgrund der Fähigkeit der CTLs und NK-Zellen zur Lyse von Zielzellen eine besondere Bedeutung bei der Elimination von Tumorzellen und mit Pathogenen infizierten Zellen darstellt. In einer Vergleichsstudie von 19 verschiedenen potentiellen Adjuvantien konnte, bei Ko-Applikation mit einem mit KLH (keyhole limpet hemocyanin) konjugierten Impfstoff gegen die Antigene MUCI-Peptid und GD3-Gangliosid, für synthetisch hergestellte CPG-DNA (CpG-ODN) die stärkste TH<sub>1</sub>-Immunantwort ermittelt werden (Kim et al. 2000).

Als Rezeptor, welcher die zelluläre Immunantwort nach der Immunisierung mit CpG-Motiven vermittelt, wurde der Toll-like Rezeptor 9 (TLR9) identifiziert (Hemmi et al. 2000). Hemmi et al. zeigten, dass bei TLR9 knock out Mäusen keine Immunantwort nach Applikation von CpG-Motiven induziert werden kann. CpG-Motive werden an der Oberfläche von Lymphozyten durch DNA-bindende Proteine, welche nicht spezifisch für die CpG-Sequenzen sind, erkannt. Daraufhin wird die CpG-DNA über einen clathrin-abhängigen endolysosomalen Weg in die Zelle aufgenommen und anschließend in ein tubuläres lysosomales Kompartiment überführt (Latz et al. 2004). Die CpG-DNA bindet danach direkt an den TLR9-Rezeptor. Latz et al. (2004) fanden heraus, dass sich dieser im Endoplasmatischen Retikulum der Makrophagen und Dendritischen Zellen befindet. Die Erkennung der CpG-Motive und die darauf folgende Triggerung des TLR9-Rezeptors, führt in APCs zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle und zur Sekretion verschiedenster Interleukine wie z.B. IL-12, IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$ , welche die TH<sub>1</sub>-Immunantwort fördern (Weeratna et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Elispot-Assay die in diesen Veröffentlichungen postulierte immunstimulierende Wirkung der CpG-Motive bestätigt werden.

Die Ergebnisse aus den Immunisierungen mit den CpG-E7SH-Konstrukten zeigen, dass die Milzzellen aus CpG16-E7SH vakzinieren Tieren eine stärkere IFN- $\gamma$ -Sekretion induzieren als die Milzzellen der CpG50-immunisierten Mäuse. Das CpG50-E7SH-Konstrukt, welches 50 CpG-Motive enthält, zeigte zudem eine schwächere Immunantwort als das pTHamp-E7SH-Konstrukt (4 CpG-Motive). Insgesamt erzielte das Konstrukt mit 16 CpG-Motiven *in vitro* die stärkste E7SH-spezifische Immunantwort. Die Tatsache, dass nicht durch mehr CpG-Motive automatisch eine bessere Immunantwort erzielt werden kann, lässt sich vermutlich mit der unspezifischen Aktivierung des Immunsystems begründen.

Kojima et al. (2002) bestätigten dieses Ergebnis, indem sie zeigten, dass durch die Ko-Applikation von CpG-Motiven mit einem HIV-1 DNA-Impfstoff die Plasmide, welche 20 CpG-Motive enthalten, die effektivsten Immunaktivatoren darstellen. Eine mögliche Begründung, dass Plasmide mit 50 CpG-Motiven die Immunantwort nicht im erhofften Masse

steigern, sondern eher sogar vermindern, könnte in der Hemmung viraler Promotoren liegen. CpG-DNA führt nach TLR9-Rezeptor-Bindung über NK-Zell-Aktivierung zu einer vermehrten Sekretion von IFN- $\gamma$ . Für IFN- $\gamma$  wurde gezeigt, dass es in der Lage ist, virale Promotoren zu hemmen (Harms et al. 1999, Qin et al. 1997). Krieg und Davis (2005) beschreiben, dass speziell 50 oder mehr CpG-Motive zu dieser Hemmung der CMV-Promotoren führen. Da im E7SH-Gen ein CMV-Promotor vorhanden ist, könnte die bei 50 CpG-Motiven vermehrte Sekretion von IFN- $\gamma$  über die CMV-Promotor-Hemmung zu einer verminderten Expression des E7SH-Gens führen und daraufhin eine schwächere Immunantwort induzieren.

## **5.8 Von den eingesetzten Vektoren zeigen der pTHamp-Vektor und der CpG16-Vektor die stärkste Tumor-Regression**

Um die Bedeutung der durch die CpG-Vektoren erzielten CTL-Aktivierung *in vivo* zu verifizieren wurden zwei unabhängige Tumor-Regressions-Experimente (B1 und B2) durchgeführt. Baines und Celis (2003) zeigten, dass eine systemische Monotherapie mit CpG-ODNs eine Tumor-Regression in bestehenden Tumoren induzieren kann. In anderen Tumor-Modellen wurde dargestellt, dass eine systemische Injektion weniger effektiv ist im Vergleich zu anderen Applikationsformen, wie zum Beispiel der peritumoralen Injektion. (Vollmer 2005, Heckelsmiller et al. 2002, Kawarada et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Applikationsformen untersucht, die intramuskuläre Injektion und die intratumorale Injektion. In beiden durchgeführten Experimenten wurde das gleiche Ergebnis erzielt. Die stärkste Tumor-Regression wurde durch das CpG16-E7SH-Konstrukt (i.t. und i.m.) und das intramuskulär applizierte pTHamp-E7SH-Konstrukt erzielt. Hierbei zeigte CpG16-E7SH i.t. unterschiedliche Ergebnisse. Im Experiment B1 konnte keine Tumor-Regression erzielt werden und im Experiment B2 ein im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS signifikant geringeres Tumorwachstum ( $P=0,04$ ). Die i.m. Applizierung des CpG16-E7SH Konstruktes im Experiment B1 zeigte ebenfalls eine signifikante ( $P=0,04$ ) Tumor-Regression im Vergleich zur Kontrolle pTHamp. Die Tumor-Regression war jedoch nicht besser als die durch pTHamp-E7SH i.m. erzielte Immunantwort. Diese war ebenfalls im Experiment B1 signifikant ( $P=0,03$ ) und im Experiment B2 hoch signifikant ( $P=0,0007$ ) im Vergleich zur Kontrolle pTHamp. Insgesamt zeigte die Immunantwort in der CpG16-E7SH-Gruppe eine ähnliche, aber nicht bessere Immunantwort als die pTHamp-E7SH-Gruppe.

Das CpG50-E7SH-Konstrukt mit 50 CpG-Motiven zeigte in beiden Experimenten sowohl i.m. als auch i.t. keine Tumor-Regression.

Beim Vergleich der mit den Leervektoren (pTHamp, CpG16 und CpG50) immunisierten Tiere konnte nur im Experiment B1 durch den Leervektor CpG16 i.t. appliziert eine tendenziell ( $P=0,053$ ) bessere Tumor-Regression erzielt werden als durch den pTHamp-Leervektor. Der Leervektor CpG50 zeigte in keinem Experiment eine Tumor-Regression. Insgesamt konnten die von Heckelsmiller et al. (2002) veröffentlichten Ergebnisse durch die Experimente B1 und B2 nicht bestätigt werden. Heckelsmiller et al. zeigten, dass CpG-ODNs als Monotherapie in murinen Tumor-Modellen eingesetzt werden können mit dem Ergebnis, auch bei größeren Tumoren eine Elimination des Tumors zu erreichen (Vollmer 2005).

In mehreren Studien am murinen Modell konnte nachgewiesen werden, dass CpG-ODNs *in vivo* zu einer effizienten anti-tumoralen Immunantwort führen können. Dies wurde z.B. für das murine intrakranielle Gliom (Carpentier et al 2000), das murine Neuroblastom (Carpentier et al. 1999), bei muriner B-CLL (Decker et al. 2000) oder muriner Leukämie (Blazar et al. 2001) gezeigt. Hierbei wurde die CpG-DNA in der Tumorthherapie einerseits als Einzelsubstanz, aber auch als Adjuvants z.B. in Kombination mit synthetischen Tumorpeptiden (Chen et al. 2004, Davila und Celis 2000) oder einem monoklonalem Antikörper beim murinen Lymphom (Wooldridge et al. 1997) verwendet.

Momentan sind verschiedene klinische Phase-1- und 2-Studien in Arbeit, welche die Möglichkeiten der Tumorthherapie mittels CpG-Monotherapie und CpG in Kombination mit Chemotherapie untersuchen. CpG-DNA wird hierbei z.B. bei Basalzell-Karzinomen, Melanomen, Non-Hodgin-Lymphomen, Nieren-Zell-Karzinomen und Brustkrebs als Monotherapie oder als Adjuvants eingesetzt (Paul 2003).

Carpentier et al. (2006) testeten das Konstrukt CpG-28 in einer klinischen Phase-1-Studie an Patienten mit Glioblastomen. Es zeigte sich hierbei, dass CpG-DNA in Dosen bis 20mg pro Injektion gut toleriert wird und nur sehr leichte Nebenwirkungen, wie mildes Fieber und leichte reversible Lymphopenien auftreten können. Auch das Konstrukt CpG 7909 (hergestellt von Coley Pharmaceutical Group) wurde als Adjuvants eines HBV-Impfstoffes (Engerix-B) bereits am Menschen getestet. Die Kombination von CpG 7909 und Engerix-B zeigte hierbei eine signifikant schnellere und stärkere HBsAg-spezifische und CTL-Immunantwort im Vergleich zum HBV-Impfstoff alleine (Cooper et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte die mittels IFN- $\gamma$ -Elisot Assay durch CpG16-E7SH hervorgerufene Steigerung der zellulären Immunantwort im Vergleich zum pTHamp-E7SH Konstrukt mittels der Tumor-Regressions-Experimente nicht bestätigt werden. Auch durch eine intratumorale Injektion der CpG-16-E7SH Vektoren konnte keine bessere Tumor-Regression als durch pTHamp-E7SH erzielt werden.

Im Experiment B2 zeigte sich, dass bereits durch die intratumorale Immunisierung mit PBS ein geringeres Tumorwachstum erreicht wird als bei nicht immunisierten unbehandelten Tieren. Dies lässt sich vermutlich auf den mechanischen Reiz zurückführen, den ein intratumoral appliziertes Volumen auf das Immunsystem ausübt. Kudo-Saito et al. (2004) erklärten, dass eine Immunantwort nach einer intratumoralen Immunisierung in zwei Typen unterteilt werden kann: (1) Die direkte Elimination von Tumorzellen durch das applizierte genetische Material, woraufhin defekte Gene wie z.B. p53 ersetzt oder inaktiviert werden und die Apoptose der Tumorzellen eingeleitet wird. (Wadler et al. 2002, Mulvihill et al. 2001). (2) Über indirekte Wege, welche durch Aktivierung von Immunzellen hervorgerufen werden, zum Beispiel über die Einführung von immunostimulatorischen Molekülen, welche das immunologische Milieu der Tumoren beeinflussen und zu einer anti-tumoralen Immunantwort führen. So wurden z.B. Zytokine wie IL-2, IL-12 and TNF $\alpha$  als Protein (Elzey et al. 2001) intratumoral injiziert und anschließend nachgewiesen, dass diese die anti-tumorale Immunantwort (CTLs) effektiv erhöhen können. Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit in den Tumor-Regressions-Experimenten durch die applizierten CpG-Vektoren nicht - wie erwartet - eine gesteigerte Tumor-Regression im Vergleich zum pTHamp-Vektor gezeigt werden. Eine Ursache hierfür könnte die Verunreinigung und Kontamination der applizierten CpG-DNA sein, denn in den Tumor-Experimenten wurden bei den mit den CpG-Konstrukten immunisierten Tieren vermehrt offene und blutige Tumorerläsionen festgestellt. Es lässt sich aber auch nicht ausschließen, dass diese blutigen Tumorerläsionen eine Nebenwirkung der CpG-DNA-Immunisierungen darstellen und möglicherweise als Ausdruck einer starken Entzündung zu interpretieren sind. In bisher veröffentlichten Studien wurden lediglich milde Nebenwirkungen nach einer CpG-Immunisierung beschrieben (Krieg und Davis 2005, Weeratna et al. 2000). Die Befürchtung, dass die starke TH<sub>1</sub>-Stimulation durch die CpG-DNA zu der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen führen könnte, hat sich bisher nicht bestätigt (Krieg und Davis 2005).

## **5.9 Re-Challenge-Tumor-Experiment**

Nach der Durchführung der Tumor-Regressions-Experimente konnten bei 8 Tieren aus verschiedenen Immunisierungs-Gruppen, welche alle mit dem E7SH, allerdings mit verschiedenen adjuvanten Genen bzw. verschiedenen Vektoren, immunisiert wurden (siehe 4.6), nach 60 Tagen keine tastbaren Tumoren detektiert werden. Diesen Tieren wurden in einem Re-Challenge-Tumor-Experiment 95 Tage nach der 1. C3-Tumorzellapplikation erneut C3-Zellen appliziert. Die Injektion erfolgte in der zur 1. Injektion kontralateralen, bisher

unbehandelten Flanke. Bei keinem der Tiere ist erneut ein Tumor gewachsen. Hingegen konnten bei allen fünf nicht immunisierten Kontrolltieren bereits nach 5 Tagen Tumore getastet werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine induzierte Immunität bei vakzinieren Tieren potentiell auch bei einer zweiten Tumorzellexposition aufrecht erhalten wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Tiere im Rahmen der Vakzinierungen HPV16-E7-spezifische Gedächtnis-Zellen ausgebildet haben. Alle Tiere, bei denen eine totale Regression eingetreten ist, wurden mit dem E7SH-Konstrukt (pTHamp-E7SH, CpG16-E7SH oder CpG50-E7SH) alleine oder zusätzlich mit unterschiedlichen adjuvanten Genen (IL-2 und GM-CSF) immunisiert. Daher lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob ein CpG-Vektor oder ein adjuvantes Gen für die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses verantwortlich ist. Zudem lässt sich aufgrund der geringen Zahl an Tieren (8) mit vollständiger Tumor-Regression im Vergleich zur Gesamtheit der immunisierten Tiere (185) kein aussagekräftiger Schluss ziehen. Man kann jedoch festhalten, dass die Tiere, welche nach der 1. Tumorzell-Applikation eine totale Tumor-Regression zeigten, auch auf längere Zeit gegenüber einer erneuten Tumorzell-Applikation der gleichen C3-Tumorzellen eine Immunität entwickelt haben. Dies verdeutlicht das Potential der HPV16-E7SH-DNA-Vakzine in Bezug auf die Induktion einer lange anhaltenden zellulären Immunantwort.

## **5.10 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die präklinische Entwicklung einer „multivalenten DNA-Vakzine“, welche die Gene HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 und HPV18-E7 enthält, verschiedene Adjuvantien auf ihre Wirkung hin untersucht. Da es sich bei den Antigenen E6 und E7 um Onkoproteine handelt, ist die Applizierung dieser DNA im Rahmen einer Vakzinierung nicht vertretbar.

In einer „Proof-of-Principle“ Studie wurde daher ein artifizielles HPV16-E7SH-Gen generiert, welches seine transformierenden Eigenschaften verloren hat, jedoch im murinen Modell eine gegen das HPV16-E7-Wildtyp-Gen gerichtete starke zelluläre Immunantwort induziert. In dieser Arbeit wurden die immunstimulierenden Wirkungen der adjuvanten Gene GM-CSF, IFN- $\gamma$  und IL-2 bei Ko-Applikation mit dem HPV16-E7SH-Gen untersucht. In den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays zeigte sich nur für das adjuvante Gen IL-2 eine Steigerung der E7-spezifischen IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zum E7SH alleine. Auch in zwei unabhängigen Tumor-Regressions-Experimenten konnte nur durch die Ko-Applikation mit dem Adjuvants IL-2 eine deutlich bessere Tumor-Regression erzielt werden. Die mit dem Konstrukt E7SH/IL-2 immunisierten Tiere zeigten eine hoch signifikante Tumor-Regression. Während

die alleine mit dem E7SH immunisierten Tiere nur eine signifikante Tumor-Regression im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen. Für die adjuvanten Gene GM-CSF und IFN- $\gamma$  konnte sowohl in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays als auch in den Tumor-Regressions-Experimenten kein adjuvanter Effekt ermittelt werden. Im Vergleich der Immunisierungsvektoren konnte in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays die stärkste Induktion der zellulären Immunantwort durch den CpG16-Vektor erzielt werden. In den Tumor-Regressions-Experimenten hingegen zeigte sich das geringste Tumorwachstum bei den mit den Konstrukten pTHamp-E7SH und CpG16-E7SH immunisierten Tieren. Durch den CpG50-Vektor konnte sowohl in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays als auch in den Tumor-Regressions-Experimenten keine Steigerung, sondern sogar eine Verringerung der Immunantwort detektiert werden.

Insgesamt konnte die Immunogenität der HPV16-E7SH-DNA-Vakzine durch das adjuvante Gen IL-2 und in den IFN- $\gamma$ -Elispot-Assays auch durch den CpG16-Vektor verbessert werden. In weiterführenden Studien sollten daher weitere mögliche adjuvante Gene sowie die Kombination verschiedener Adjuvantien untersucht werden. Auch der Einsatz CpG-optimierter Vektoren sollte aufgrund der Vielzahl an positiven Studien (Heckelsmiller et al. 2002, Krieg und Davis 2005), welche für CpG-DNA eine starke Immunantwortsteigerung zeigen, weiterführend untersucht werden.

Eine andere Möglichkeit, die Immunogenität des E7SH zu steigern, ist der gleichzeitige Einsatz kostimulierender Moleküle wie z.B. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2). Diese Moleküle werden von professionellen APCs exprimiert und sind, zusammen mit MHC-gebundenen Epitopen, essentiell, um ruhende/ naive CTLs zu aktivieren (Koulova et al. 1991). Vielversprechende Ergebnisse wurden bereits im murinen Modell bei gleichzeitiger Applikation von B7.1 zusammen mit einem Tumor-Antigen erzielt (Corr et al. 1997). Agadjanyan et al. (1999) zeigten, dass eine antigenspezifische CTL-Antwort ausschließlich in Mäusen induziert werden kann, die mit einem Antigen und B7.2 genetisch immunisiert wurden. Im Hinblick auf eine „multivalente DNA-Vakzine“ mit den Genen HPV16-E6, HPV16-E7, HPV18-E6 und HPV18-E7 sollten die Gene HPV16-E6, HPV18-E6 und HPV18-E7 analog zum „Proof-of-Principle“ Gen der HPV16-E7SH-Studie verändert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten Adjuvantien könnten in Zukunft auch bei diesen neu generierten E6- und E7SH-Konstrukten sowie anderen DNA-Vakzinen zur Anwendung kommen. Eine DNA-Vakzine wäre in Zukunft aufgrund ihrer Stabilität, ihrer leichten Modifizierbarkeit und ihrer billigen und einfachen Synthetisierung gerade für Immunisierungen in Dritte-Welt-Ländern eine sehr gute Alternative.



## 6. Literaturverzeichnis

### A

**Agadjanyan** MG, Kim JJ, Trivedi N, Wilson DM, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, Chalian AA, Maldonado MA, Williams WV, Weiner DB. 1999. CD86 (B7-2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol*, 162 6, 3417-27.

**Arulkanthan** A, Brown WC, McGuire TC, Knowles DP. 1999. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. *Infect Immun*, 67 (7):3481-7.

### B

**Baines** J, Celis E. 2003. Immune-mediated Tumor Regression induced by CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Clinical Cancer Research*, 9 (7):2693-2700.

**Beijersbergen** RL and Bernards R. 1996. Cell cycle regulation by the retinoblastoma family of growth inhibitory proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1287 (2-3):103-20.

**Berg** M, Difatta J, Hoiczky E, Schlegel R, Ketner G. 2005. Viable adenovirus vaccine prototypes: high-level production of a papillomavirus capsid antigen from the major late transcriptional unit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (12):4590-5.

**Berry** JM, Palefsky JM. 2003. A review of human papillomavirus vaccines: from basic science to clinical trials. *Front Biosci*, 8:s333-45.

**Bird** AP. 1987. Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 58:281-5.

**Blazar** BR, Krieg AM, Taylor PA. 2001. Synthetic unmethylated cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotides are potent stimulators of antileukemia responses in naive and bone marrow transplant recipients. *Blood*, 98 (4):1217-25

**Boehm** U, Klamp T, Groot M, Howard JC. 1997. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*, 15:749-95.

**Bosch** FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective international biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87 (11):796-802.

**Boshart** M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J*, 3 (5):1151-7.

**Bradford** MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

**Breitbart** F, Coursaget P. 1999. Human papillomavirus vaccines. *Semin Cancer Biol*, 9 (6):431-44.

**Breitbart** F, Kimbaurer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. 1995. Immunization with viruslike- particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*, 69 (6):3959-63.

**Bu** J, Song Y, Rompato G, Burgess DJ, Garmendia AE. 2003. Co-delivery of IL-2 or liposomes augment the response of mice to a DNA vaccine for pseudorabies virus IE180. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 26 (3):175-87.

### C

**Cai** H, Yu DH, Tian X, Zhu YX. 2005. Coadministration of Interleukin 2 plasmid DNA with combined DNA vaccine significantly enhances the protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *DNA Cell Biol*, 24 (10):605-13.

- Calarota S**, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandstrom E, Wahren B. 1998. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet*, 2; 351 (9112):1320-5.
- Cardozo C**, Kohanski RA. 1998. Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". *J Biol Chem*, 273 (27):16764-70.
- Carpentier AF**, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. 1999. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res*, 59 (21):5429-32.
- Carpentier AF**, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY. 2000. Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res*, 6 (6):2469-73.
- Carpentier A**, Laigle-Donadey F, Zohar S, Capelle L, Behin A, Tibi A, Martin-Duverneuil N, Sanson M, Lacomblez L, Taillibert S, Puybasset L, Van Effenterre R, Delattre JY, Carpentier AF. 2006. Phase 1 trial of a CpG oligodeoxynucleotide for patients with recurrent glioblastoma. *Neuro-oncol*, 2006 8 (1):60-66.
- Carreno BM**, Collins M. 2002. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 20:29-53.
- Cheah PL**, Looi LM. 1998. Biology and pathological associations of the human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol*, 20 (1):1-10.
- Chen YF**, Lin CW, Tsao YP, Chen SL. 2004. Cytotoxic-T-lymphocyte human papillomavirus type 16 E5 peptide with CpG-oligodeoxynucleotide can eliminate tumor growth in C57BL/6 mice. *J Virol*, 78 (3):1333-43
- Chiang CM**, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. 1992. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (13):5799-803.
- Cho JH**, Youn JW, Sung YC. 2001. Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J Immunol*, 167 (10):5549-57.
- Chow YH**, Chiang BL, Lee YL, Chi WK, Lin WC, Chen YT, Tao MH. 1998. Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J Immunol*, 160 (3):1320-9.
- Christensen ND**, Hopfl R, DiAngelo SL, Cladel NM, Patrick SD, Welsh PA, Budgeon LR, Reed CA, Kreider JW. 1994. Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol*, 75 (9):2271-6.
- Cole ST**, Danos O. 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J Mol Biol*, 193 (4):599-608.
- Coleman N**, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. 1994. Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol*, 102 (6):768-74.
- Cooper CL**, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, Cameron DW, Heathcote J. 2004. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol*, 24 (6):693-701
- Corr M**, Lee DJ, Carson DA, Tighe H. 1996. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med*, 184 (4):1555-60.
- Corr M**, Tighe H, Lee D, Dudler J, Trieu M, Brinson DC, Carson DA. 1997. Costimulation provided by DNA immunization enhances antitumor immunity. *J Immunol*, 15; 159 (10):4999-5004.
- Cripe TP**, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid PG, Durst M, Gissmann L, Roman A, Turek LP. 1987. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *Embo J*, 6 (12):3745-53.

**Cullen** AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*, 65 (2):606-12.

## **D**

**Danko** I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS, Wolff JA. 1994. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther*, 1(2):114-21.

**Davila** E, Celis E. 2000. Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol*, 165 (1):539-47.

**Davis** HL, Michel ML, Whalen RG. 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet*, 2 (11):1847-51.

**Davis** HL, Michel ML, Whalen RG. 1995. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann NY Acad Sci*, 772:21-29.

**Decker** T, Schneller F, Sparwasser T, Tretter T, Lipford GB, Wagner H, Peschel C. 2000. Immunostimulatory CpG-oligonucleotides cause proliferation, cytokine production, and an immunogenic phenotype in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 95 (3):999-1006.

**de Villiers** EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 20;324(1):17-27.

**de Villiers** EM. 1997. Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol*, 15 (2):199-206.

**de Villiers** EM. 1994. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol*, 186:1-12.

**Del Vecchio** AM, Romanczuk H, Howley PM, Baker CC. 1992. Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol*, 66 (10):5949-58.

**Delius** H, Hofmann B. 1994. Primer-directed sequencing of human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol*, 186:13-31.

**Delius** H, Saegling B, Bergmann K, Shamanin V, de Villiers EM. 1998. The genomes of three of four novel HPV types, defined by differences of their L1 genes, show high conservation of the E7 gene and the URR. *Virology*, 240 (2):359-65.

**Deml** L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, Wolf H. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expressing and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *Journal of Virology*, 75 (22):10991-11001.

**Disis** ML, Shiota FM, McNeel DG, Knutson KL. 2003. Soluble cytokines can act as effective adjuvants in plasmid DNA vaccines targeting self tumor antigens. *Immunobiology*, 207 (3):179-86.

**Doan** T, Herd KA, Lambert PF, Fernando GJ, Street MD, Tindle RW. 2000. Peripheral tolerance to human papillomavirus E7 oncoprotein occurs by cross-tolerization, is largely Th-2-independent, and is broken by dendritic cell immunization. *Cancer Res*, 1;60(11):2810-5.

**Doe** B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. 1996. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (16):8578-83.

**Doorbar** J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352 (6338):824-7.

**Doorbar** J, Foo C, Coleman N, Medcalf L, Hartley O, Prospero T, Naphthine S, Sterling J, Winter G, Griffin H. 1997. Characterization of events during the late stages of HPV16 infection in vivo using high-affinity synthetic Fabs to E4. *Virology*, 238 (1):40-52.

**Durst M**, Seagon S, Wanschura S, zur Hausen H, Bullerdiek J. 1995. Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro. *Cancer Genet Cytogenet*, 85(2), 105-112.

**Durst M**, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*, 66 (7):1515-22.

**Durst M**, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 (12):3812-5.

---

**E**

**Elzey BD**, Siemens DR, Ratliff TL, Lubaroff DM. 2001. Immunization with type 5 adenovirus recombinant for a tumor antigen in combination with recombinant canarypox virus (ALVAC) cytokine gene delivery induces destruction of established prostate tumors. *Int J Cancer*, 15; 94 (6):842-9.

**Evander M**, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. 1997. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*, 71 (3):2449-56.

---

**F**

**Feltkamp MC**, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, Drijfhout JW, ter Schegget J, Melief CJ, Kast WM. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol*, 23(9), 2242-9.

**Fligge C**, Giroglou T, Streeck RE, Sapp M. 2001. Induction of type-specific neutralizing antibodies by capsomeres of human papillomavirus type 33. *Virology*, 283 (2):353-7.

**Fomsgaard A**. 1999. HIV-1 DNA vaccines. *Immunol Lett*, 65 (1-2):127-31.

**Franco EL**, Schlecht NF, Saslow D. 2003. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*, 9 (5):348-59.

**Frattini MG**, Laimins LA. 1994. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. *Virology*, 204 (2):799-804.

**Funk JO**, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. 1997. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, 11 (16):2090-100.

---

**G**

**Gage JR**, Meyers C, Wettstein FO. 1990. The E7 proteins of the nononcogenic human papillomavirus type 6b (HPV-6b) and of the oncogenic HPV-16 differ in retinoblastoma protein binding and other properties. *J Virol*, 64 (2):723-30.

**Gissmann L**, Osen W, Muller M, Jochmus I. 2001. Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology*, 44 (2-3):167-75.

**Gonzalez SL**, Stremlau M, He X, Basile JR, Munger K. 2001. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*, 75 (16):7583-91.

**Grande C**, Firvida JL, Navas V, Casal J. 2006. Interleukin-2 for the treatment of solid tumors other than melanoma and renal cell carcinoma. *Anticancer Drugs*, 17 (1):1-12.

**Gregersen JP**. 2001. DNA vaccines. *Naturwissenschaften*, 88 (12):504-13.

---

**H**

**Hagensee ME**, Olson NH, Baker TS, Galloway DA. 1994. Three-dimensional structure of vaccinia virus-produced human papillomavirus type 1 capsids. *J Virol*, 68 (7):4503-5.

**Halbert CL**, Demers GW, Galloway DA. 1992. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol*, 66 (4):2125-34.

- Hanke T**, McMichael AJ. 2000. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med*, 6(9), 951-5.
- Hanke T**, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, Mc Michael A. 1998. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine*, 16(4), 426-435.
- Harms JS**, Oliveira SC, Splitter GA. 1999. Regulation of transgene expression in genetic immunization. *Braz J Med Biol Res*, 32 (2):155-62.
- Hartmann G**, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. 2000. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol*, 164 (3):1617-24.
- Heckelsmiller K**, Rall K, Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdorfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G. 2002. Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model. *J Immunol*, 169 (7):3892-9.
- Hemmi H**, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408 (6813):740-5.
- Hengstermann A**, Linares LK, Ciechanover A, Whitaker NJ, Scheffner M. 2001. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 (3):1218-23.
- Hertoghs KM**, Ellis JH, Catchpole IR. 2003. Use of locked nucleic acid oligonucleotides to add functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 31 (20):5817-30.
- Hoppe-Seyler F**, Butz K. 1994. Cellular control of human papillomavirus oncogene transcription. *Mol Carcinog*, 10(3):134-41.
- Hsieh CS**, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260 (5107):547-9.
- Hubbert NL**, Sedman SA, Schiller JT. 1992. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol*, 66 (10):6237-41.
- Huibregtse JM**, Scheffner M, Howley PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J*, 10 (13):4129-35.
- 
- J**
- 
- Jakob T**, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol*, 161 (6):3042-9.
- Jacobs MV**, Snijders PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. 1997. A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol*, 35 (3):791-5.
- Ji H**, Wang TL, Chen CH, Pai SI, Hung CF, Lin KY, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC. 1999. Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther*, 10 (17):2727-40.
- Johnston SA**, Talaat AM, McGuire MJ. 2002. Genetic immunization: what's in a name? *Arch Med Res*, 33 (4):325-9.
- Jones DL**, Munger K. 1997. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev*, 11 (16):2101-11.

**K**

- Kawana Y**, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T. 2001. Human papillomavirus type 16 minor capsid protein L2 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to the cell surface and enters the cytoplasm. *J Virol*, 75 (5):2331-6.
- Kawarada Y**, Ganss R, Garbi N, Sacher T, Arnold B, Hammerling GJ. 2001. NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 167 (9):5247-53.
- Kim SK**, Ragupathi G, Cappello S, Kagan E, Livingston PO. 2000. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*, 15; 19 (4-5):530-7.
- Kim JJ**, Yang JS, Manson KH, Weiner DB. 2001. Modulation of antigen-specific cellular immune responses to DNA vaccination in rhesus macaques through the use of IL-2, IFN-gamma, or IL-4 gene adjuvants. *Vaccine*, 21; 19 (17-19):2496-505.
- Kim JJ**, Yang JS, Montaner L, Lee DJ, Chalian AA, Weiner DB. 2000. Coimmunization with IFN-gamma or IL-2, but not IL-13 or IL-4 cDNA can enhance Th1-type DNA vaccine-induced immune responses in vivo. *J Interferon Cytokine Res*, 20 (3):311-9.
- Kirnbauer R**, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (24):12180-4.
- Kirnbauer R**, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, Lowy DR, Schiller JT. 1993. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol*, 67 (12):6929-36.
- Kjaer SK**, van den Brule AJ, Bock JE, Poll PA, Engholm G, Sherman ME, Walboomers JM, Meijer CJ. 1996. Human papillomavirus- the most significant risk determinant of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*, 65 (5):601-6.
- Kleine-Lowinski K**, Gillitzer R, Kuhne-Heid R, Rosl F. 1999. Monocyte-chemo-attractant-protein-1 (MCP-1)-gene expression in cervical intra-epithelial neoplasias and cervical carcinomas. *Int J Cancer*, 82 (1):6-11.
- Klingelutz AJ**, Foster SA, McDougall JK. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 380 (6569):79-82.
- Klinman DM**, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12 and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (7):2879-83.
- Knowles G**, O'Neil BW, Campo MS. 1996. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *J Virol*, 70 (12):8451-8.
- Kojima Y**, Xin KQ, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, Ozaki T, Hoshino Y, Journai N, Nakazawa M, Klinman D, Okuda K. 2002 Jul. Adjuvant effect of multi-CPG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine*, 20 (23-24):2857-65.
- Koulova L**, Clark EA, Shu G, Dupont B. 1991. The CD28 ligand B7/BB1 provides costimulatory signal for alloactivation of CD4+ T cells. *J Exp Med*, 173 (3):759-62.
- Koutsky LA**, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, DeRouen TA, Galloway DA, Vernon D, Kiviat NB. 1992. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*, 327 (18):1272-8.
- Kozak M**. 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 266 (30):19867-70.
- Krieg AM**. 2001. Immune effects and mechanisms of action of CpG motifs. *Vaccine*, 19 (6):618-22.
- Krieg AM**. 2002. CpG-motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*, 20:709-60.

**Krieg** AM, Davis HL. 2005. CpG ODN as a Th1 immune enhancer for prophylactic and therapeutic vaccines. In: Hackett CJ, Harn DAJ. Vaccine Adjuvants Immunological and Clinical Principles. First Edition. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 87-110.

**Krieg** AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374 (6522):546-9.

**Kusakabe** K, Xin KQ, Katoh H, Sumino K, Hagiwara E, Kawamoto S, Okuda K, Miyagi Y, Aoki I, Nishioka K, Klinman D, Okuda K. 2000. The timing of GM-CSF expression plasmid administration influences the Th1/Th2 response induced by an HIV-1-specific DNA vaccine. *J Immunol*, 164 (6):3102-11.

**Kudo-Saito** C, Schlom J, Hodge JW. 2004. Intratumoral vaccination and diversified subcutaneous/intratumoral vaccination with recombinant encoding a tumor antigen and multiple costimulatory molecules. *Clin Cancer Res*, 10 (3):1090-9.

**Kwissa** M, Kroger A, Hauser H, Reimann J, Schirmbeck R. 2003. Cytokine-facilitated priming of CD8+ T cell responses by DNA vaccination. *J Mol Med*, 81(2):91-101.

## **L**

**Laemmli** UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259, 680-5.

**Lambert** PF. 1991. Papillomavirus DNA replication. *J Virol*, 65 (7):3417-20.

**Larson** AA, Liao SY, Stanbridge EJ, Cavenee WK, Hampton GM. 1997. Genetic alterations accumulate during cervical tumorigenesis and indicate a common origin for multifocal lesions. *Cancer Res*, 57 (19):4171-6.

**Latz** E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. 2004. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, 5 (2):190-8.

**Lechner** MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J*, 11 (8):3045-52.

**Lehtinen** M, Rantala I, Toivonen A, Luoto H, Aine R, Lauslahti K, Yla-Outinen A, Romppanen U, Paavonen J. 1993. Depletion of Langerhans cells in cervical HPV infection is associated with replication of the virus. *Apmis*, 101 (11):833-7.

**Li** M, Beard P, Estes PA, Lyon MK, Garcea RL. 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol*, 72 (3):2160-7.

**Liu** L, Zhou X, Liu H, Xiang L, Yuan Z. 2005. CpG motif acts as a 'danger signal' and provides a T helper type 1-biased microenvironment for DNA vaccination. *Immunology*, 115(2):223-30.

**Liu** MA. 1998. Vaccine developments. *Nat Med*, 4(5 Suppl):515-9.

**Ljunggren** HG, Karre K. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants: Analysis of the mechanism. *J Exp Med*, 162(6), 1745-59.

**Longworth** MS, Laimins LA. 2004. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2):362-72.

**Lu** M, Lohrengel B, Hilken G, Kemper T, Roggendorf M. 2002. Woodchuck Gamma Interferon upregulates Major Histocompatibility Complex Class I Transcription but is unable to deplete Woodchuck Hepatitis Virus Replication Intermediates and RNAs in persistently infected Woodchuck Primary Hepatocytes. *Journal of Virology*, 76 (1):58-67.

**Lundberg** KS, Shoemaker DD, Adams MW, Short JM, Sorge JA, Mathur EJ. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*, 1;108(1):1-6.

**M**

- Maiman M**, Fruchter RG, Serur E, Remy JC, Feuer G, Boyce J. 1990. Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. *Gynecol Oncol*, 38 (3):377-82.
- Marshall JL**, Hoyer RJ, Toomey MA, Faraguna K, Chang P, Richmon E, Pedicano JE, Gehan E, Peck RA, Arlen P, Tsang KY, Schlom J. 2000. Phase I study in cancer patients of diversified prime-and-boost vaccination protocol using recombinant caccina virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anticarcinoembryonic immune response. *J Clin Oncol*, 18:3964-3973.
- Marzo AL**, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, Scott B. 2000. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*, 165 (11):6047-55.
- Mohr IJ**, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR. 1990. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science*, 250 (4988):1694-9.
- Morelli AE**, Sananes C, Di Paola G, Paredes A, Fainboim L. 1993. Relationship between types of human papillomavirus and Langerhans cells in cervical condyloma and intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*, 99 (2):200-6.
- Muller M**, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AB, Alonso A, Zentgraf H, Zhou J. 1995. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol*, 69 (2):948-54.
- Muller M**, Zhou J, Reed TD, Rittmuller C, Burger A, Gabelsberger J, Braspenning J, Gissmann L. 1997. Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology*, 234 (1):93-111.
- Mulvihill S**, Warren R, Venook A, Adler A, Randlev B, Heise C, Kim D. 2001. Safety and feasibility of injection with an E1B-55 kDa gene-deleted, replication-selective adenovirus (ONYX-015) into primary carcinomas of the pancreas: a phase I trial. *Gene Ther*, 8 (4):308-15.
- Munger K**, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63 (10):4417-21.
- Munoz N**, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*, 20; 111 (2):278-85.
- Munoz N**, Bosch FX. 1996. The causal link between HPV and cervical cancer and its implications for prevention of cervical cancer. *Bull Pan Am Health Organ*, 30 (4):362-77.
- Myers G**, Lu H, Calef C, Leitner T. 1996. Heterogeneity of papillomaviruses. *Semin Cancer Biol*, 7 (6):349-58.

**N**

- Nakagawa M**, Stites DP, Palefsky JM, Kneass Z, Moscicki AB. 1999. CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6 (4):494-8.

**O**

- O'Brien PM**, Saveria Campo M. 2002. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res*, 88 (1-2):103-17.
- Öhlschläger P**. 2003. Untersuchungen zu neuartigen prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierungs-Strategien gegen das Humane Papillomvirus Typ 16. [Dissertation]. Heidelberg:Ruprecht-Karls-Universität.
- Öhlschläger P**, Osen W, Dell K, Faath S, Garcea RL, Jochmus I, Muller M, Pawlita M, Schafer K, Sehr P, Staib C, Sutter G, Gissmann L. 2003. Human papillomavirus type 16 L1 capsomeres induce L1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol*, 77 (8):4635-45.



**Öhlschlager** P, Pes M, Osen W, Dürst M, Schneider A, Gissmann L, Kaufmann A. 2006. An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA Vaccine candidate (HPV-16-E7SH) induces an E7 Wildtype-specific T Cell Response. *Vaccine*, 5;24(15):2880-93.

**Osen** W, Peiler T, Ohlschlager P, Caldeira S, Faath S, Michel N, Muller M, Tommasino M, Jochmus I, Gissmann L. 2001. A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine*, 19 (30):4276-86.

**Ostor** AG. 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*, 12 (2):186-92.

## **P**

---

**Paintsil** J, Muller M, Picken M, Gissmann L, Zhou J. 1998. Calcium is required in reassembly of bovine papillomavirus in vitro. *J Gen Virol*, 79 (5):1133-41.

**Parkin** DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics '2002'. *CA Cancer J Clin*, 55 (2):74-108.

**Paul** S. 2003. Technology Evaluation: CpG-7909, Coley. *Curr Opin Mol Ther*, 5 (5):553-9.

**Pavlenko** M, Roos AK, Lundqvist A, Palmborg A, Miller AM, Ozenci V, Bergman B, Egevad L, Hellstrom M, Kiessling R, Masucci G, Wersall P, Nilsson S, Pisa P. 2004. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br J Cancer*, 16; 91 (4):688-94.

**Perales** MA, Fantuzzi G, Goldberg SM, Turk MJ, Mortazavi F, Busam K, Houghton AN, Dinarello CA, Wolchok JD. 2002. GM-CSF DNA induces specific patterns of cytokines and chemokines in the skin: implications for DNA vaccines. *Cytokines Cell Mol Ther*, 7 (3):125-33.

**Podack** ER, Kupfer A. 1991. T-cell effector functions: mechanisms for delivery of cytotoxicity and help. *Annu Rev Cell Biol*, 7:479-504.

**Prazeres** DM, Ferreira GN, Monteiro GA, Cooney CL, Cabral JM. 1999. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends Biotechnol*, 17 (4):169-74.

## **Q**

---

**Qin** L, Ding Y, Pahud DR, Chang E, Imperiale MJ, Bromberg JS. 1997. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther*, 8 (17):2019-29.

## **R**

---

**Rankin** R, Pontarollo R, Ioannou X, Krieg AM, Hecker R, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. 2001. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11 (5):333-40.

**Reimann** J, Bohm W, Schirmbeck R. 1994. Alternative processing pathways for MHC class I-restricted epitope presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biol Chem*, 375 (11):731-6.

**Resing** ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM. 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol*, 154 (11):5934-43.

**Richart** RM. 1990. A modified terminology for cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet Gynecol*, 75 (1):131-3.

**Richart** RM. 1973. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu*, 8:301-28.

**Roberts** S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. 1993. Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology*, 197 (1):176-87.

**Roden** RB, Kirnbauer R, Jenson AB, Lowy DR, Schiller JT. 1994. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol*, 68 (11):7260-6.

**Rodriguez** MI, F.M., Alonso A. 2000. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. *Oncogene*, 19 (33):3727-32.

**Romanczuk** H, Thierry F, Howley PM. 1990. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol*, 64 (6):2849-59.

**Rosato** A, Zoso A, Milan G, Macino B, Dalla SS, Tosello V, Di Carlo E, Musiani P, Whalen RG, Zanovello P. 2003. Individual analysis of mice vaccinated against a weakly immunogenic self tumor-specific antigen reveals a correlation between CD8 T cell response and antitumor efficacy. *J Immunol*, 15; 171 (10):5172-9.

**Rose** RC, White WI, Li M, Suzich JA, Lane C, Garcea RL. 1998. Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol*, 72 (7):6151-4.

**Rudolf** MP, Nieland JD, DaSilva DM, Velders MP, Muller M, Greenstone HL, Schiller JT, Kast WM. 1999. Induction of HPV16 capsid protein-specific human T cell responses by virus-like particles. *Biol Chem*, 380 (3):335-40.

## S

---

**Sapp** M, Fligge C, Petzak I, Harris JR, Streeck RE. 1998. Papillomavirus assembly requires trimerization of the major capsid protein by disulfides between two highly conserved cysteines. *J Virol*, 72 (7):6186-9.

**Sapp** M, Volpers C, Muller M, Streeck RE. 1995. Organization of the major and minor capsid proteins in human papillomavirus type 33 virus-like particles. *J Gen Virol*, 76 (9):2407-12.

**Sato** Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen MD, Silverman GJ, Lotz M, Carson DA, Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA-sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science*, 273:352-4.

**Schafer** K, Muller M, Faath S, Henn A, Osen W, Zentgraf H, Benner A, Gissmann L, Jochmus I. 1999. Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer*, 81 (6):881-8.

**Scheerlinck** JY. 2001. Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine*, 19 (17-19):2647-2656.

**Scheffner** M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 75 (3):495-505.

**Schiffman** MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S. 1993. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*, 85 (12):958-64.

**Schneider** A, Durst M, Kaufmann AM. 2001. HPV infection and cervical carcinoma- epidemiology, detection and immunology. *Zentralbl Gynakol*, 123 (4):179-85.

**Schumacher** TN, Heemels MT, Neefjes JJ, Kast WM, Melief CJ, Ploegh HL. 1990. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell*, 62(3), 563-7.

**Sedman** T, Sedman J, Stenlund A. 1997. Binding of the E1 and E2 proteins to the origin of replication of bovine papillomavirus. *J Virol*, 71 (4):2887-96.

**Shamanin** V, Glover M, Rausch C, Proby C, Leigh IM, zur Hausen H, de Villiers EM. 1994. Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients. *Cancer Res*, 54 (17):4610-3.

**Shi** W, Bu P, Liu J, Polack A, Fisher S, Qiao L. 1999. Human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine: mutation in the open reading frame of E7 enhances specific cytotoxic T-lymphocyte induction and antitumor activity. *J Virol*, 73(9):7877-81.

**Shope** RE, Hurst EW. 1933. Infectious papillomatosis of rabbits: with a note on the histopathology. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol 58, 607-624.

**Sibbet** GJ, Campo MS. 1990. Multiple interactions between cellular factors and the non-coding region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*, 71 (11):2699-707.

**Sin** JI, Kim JJ, Boyer JD, Ciccarelli RB, Higgins TJ, Weiner DB. 1999. In vivo modulation of vaccine-induced immune responses toward a Th1 phenotype increases potency and vaccine effectiveness in a herpes simplex virus type 2 mouse model. *J Virol*, 73 (1):501-9.

**Slavik** JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. 1999. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res*, 19 (1):1-24.

**Smahel** M, Sima P, Ludvikova V, Vonka V. 2001. Modified HPV16 E7 Genes as DNA Vaccine against E7-Containing Oncogenic Cells. *Virology*, 15 2001, 281(2) p231-8.

**Speidel** K, Osen W, Faath S, Hilgert I, Obst R, Braspenning J, Momburg F, Hammerling GJ, Rammensee HG. 1997. Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol*, 27(9), 2391-9.

**Stacey** KJ, Sweet MJ, Hume DA. 1996. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, 157 (5):2116-22.

**Stanley** MA. 2003. Progress in prophylactic and therapeutic vaccines for human papillomavirus infection. *Expert Rev Vaccines*, 2 (3):381-9.

**Steinberg** T, Ohlschlager P, Sehr P, Osen W, Gissmann L. 2005. Modification of HPV 16 E7 genes: correlation between the level of protein expression and CTL response after immunization of C57BL/6 mice. *Vaccine*, 23 (9):1149-57.

**Stern** PL, Faulkner R, Veranes EC, Davidson EJ. 2001. The role of human papillomavirus vaccines in cervical neoplasia. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 15 (5):783-99.

**Stoppler** MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. 1996. The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology*, 223 (1):251-4.

**Street** NE, Mosmann TR. 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *Faseb J*, 5 (2):171-7.

**Stubenrauch** F, Laimins LA. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*, 9 (6):379-86.

**Sun** X, Hodge LM, Jones HP, Tabor L, Simecka JW. 2002. Co-expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with antigen enhances humoral and tumor immunity after DNA vaccination. *Vaccine*, 20:1466-74.

**Syrjanen** KJ, Mantyjarvi R, Vayrynen M, Yliskoski M, Syrjanen SM, Saarikoski S, Nurmi T, Parkkinen S, Castren O. 1987. Cervical smears in assessment of the natural history of human papillomavirus infections in prospectively followed women. *Acta Cytol*, 31 (6):855-65.

---

## **T**

**Tanaka** K, Kasahara M. 1998. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev*, 163:161-76.

**Tindle** RW, Frazer IH. 1994. Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 186:217-53.

**Townsend** WL, Gorrell MD, Mayer R. 1997. Langerhans cells in the development of skin cancer: a qualitative and quantitative comparison of cell markers in normal, acanthotic and neoplastic ovine skin. *Pathology*, 29 (1):42-50.

**Tsai** SL, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Huang HC, Chuang YL, Lee TH, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. 2003. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci*, 10 (1):120-35.

## U

**Ulmer** JB, Donnelly JJ, Liu MA. 1994. Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol*, 24 (7):1590-6.

**Ustav** M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A. 1991. Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1. *Embo J*, 10 (13):321-9.

## V

**Van der Burg** SH, de Jong A, Welters MJP, Offringa R, Melief CJ. 2002. The status of HPV16-specific T-cell reactivity in health and disease as a guide to HPV vaccine development. *Virus Research*, 89:275-284.

**Van Regenmortel** MH. 2001. Perspectives on binomial names of virus species. *Arch Virol*, 146 (8):1637-40.

**Velders** MP, Weijzen S, Eiben GL, Elmishad AG, Kloetzel PM, Higgins T, Ciccarelli RB, Evans M, Man S, Smith L, Kast WM. 2001. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. *J Immunol*. 1;166(9):5366-73.

**Viac** J, Guerin-Reverchon I, Chardonnet Y, Bremond A. 1990. Langerhans cells and epithelial cell modifications in cervical intraepithelial neoplasia: correlation with human papillomavirus infection. *Immunobiology*, 180 (4-5):328-38.

**Vollmer** J. 2005 Progress in drug development of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide ligands for TLR9. *Expert Opin Biol Ther*, 5 (5):673-82.

**Vollmer** J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM. 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol*, 34 (1):251-62.

**Volpers** C, Unckell F, Schirmacher P, Streeck RE, Sapp M. 1995. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. *J Virol*, 69 (6):3258-64.

**von Mehren** M, Arlen P, Gulley J, Rogatko A, Cooper HS, Meropol NJ, Alpaugh RK, Davey M, McLaughlin S, Beard MT, Tsang KY, Schlom J, Weiner LM. 2001. The influence of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and prior chemotherapy on the immunological response to a vaccine (ALVAC-CEA B7.1) in patients with metastatic carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 7:1181-1191,

## W

**Wadler** S, Makower D, Yu B, Tan JY, Rozenblit A, Kaufmann H, Edelmann M, Lane ME, Zwiebel J. 2002. Clinical application of p53-directed gene therapy. *Suppl Tumori*, 1 (6):S21.

**Walboomers** JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189 (1):12-9.

**Walther** W, Stein U, Voss C, Schmidt T, Schleef M, Schlag PM. 2003. Stability analysis for long-term storage of naked DNA: impact on nonviral in vivo gene transfer. *Analytical Biochemistry* 318:230-235.

**Wang** M, Wang LL, Chen LF, Han YH, Zou YH, Si JY, Song GX. 2003. Expression of human papillomavirus type 6 L1 and L2 isolated in China and self assembly of virus-like particles by the products. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*, 35 (1):27-34 (Abstract).

**Weeratna** RD, McCluskie MJ, Xu Y, Davis HL. 2000. CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine*, 18 (17):1755-62.

**Wells** SI, Aronow BJ, Wise TM, Williams SS, Couget JA, Howley PM. 2003. Transcriptome signature of irreversible senescence in human papillomavirus-positive cervical cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (12):7093-8.

**Williams** SG, Cranenburgh RM, Weiss AM, Wrighton CJ, Sherratt DJ, Hanak JA. 1998. Repressor titration: a novel system for selection and stable maintenance of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res*, 26 (9):2120-4.

**Wilson** VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. 2002. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*, 24 (3):275-90.

**Wolff** JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1 (6):363-9.

**Wooldridge** JE, Ballas Z, Krieg AM, Weiner GJ. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood*, 89 (8):2994-8.

---

**X**

**Xiang** Z, Ertl HCJ. 1995. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity*, 2 129-135.

---

**Y**

**Yamamoto** S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. 1992. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol*, 36 (9):983-97.

**Yi** AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. 1998. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol*, 160 (12):5898-906.

**Yoon** HA, Aleyas AG, George JA, Park SO, Han YW, Lee JH, Cho JG, Eo SK. 2006. Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylactic DNA vaccine against pseudorabies virus through enhanced immune responses. *Microbiol Immunol*, 50 (2):83-92.

**Yuan** H, Estes PA, Chen Y, Newsome J, Olcese VA, Garcea RL, Schlegel R. 2001. Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol*, 75 (17):7848-53.

---

**Z**

**zur Hausen** H. 2000. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 3;92(9):690-8.

**zur Hausen** H. 1991. Viruses in human cancers. *Science*, 22;254(5035):1167-73.

**zur Hausen** H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*, 36 (2: pt 2: 794.

**Zwerschke** W, Jansen-Durr P. 2000. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. *Adv Cancer Res*, 78:1-29.

## 7. Anhang

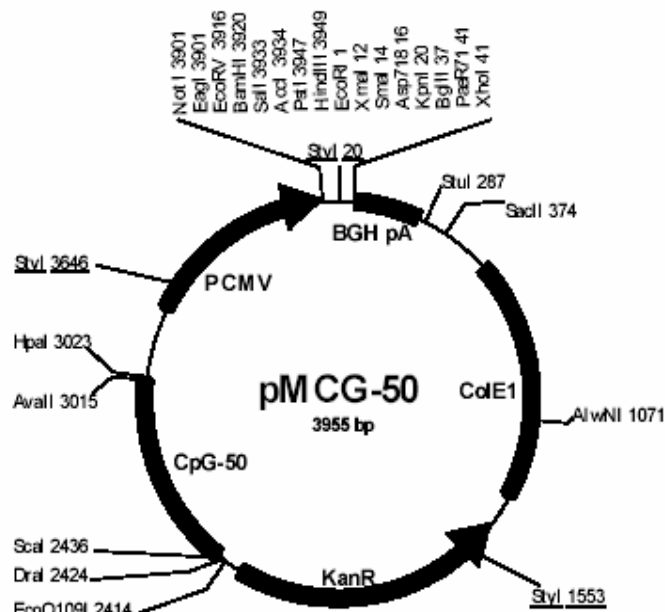
### 7.1 Vektorkarten

Bezeichnung: **CpG50-E7SH**

Name des Herstellers: Stefan Heymel  
 Datum: Mai 2004  
 Resistenz: Kanamycin  
 Bakterienstamm: DH5 $\alpha$   
 Ausgangsplasmid: Coley Pharma  
 Ottawa/Canada

Klonierungsstrategie:

- Insertlänge: 483bp
- Insert: 16 E7SH
- Produkt: rearrangiertes HPV Onkogen
- Promotor: CMV
- Nukleotidsequenz - Insert:



Not I  
↓

Kozak

5' -----pmCG-50 Vektor-----GCG GCC GC CCC GCC GCC ACC

1 ATG CAC GGC GAC ACC CCC ACC CTG CAC GAG TAC ATG

37 CTG GAC CTG CAG CCC GAG ACC ACC GAC CTG TAC TGC

73 ATC TGC AGC CAG AAA CCC AAG TGC GAC AGC ACC CTG

109 CGG CTG TGC GTG CAG AGC ACC CAC GTG GAC ATC CGG

145 ACC CTG GAG GAC CTG CTG ATG GGC ACC CTG GGC ATC

181 GTG TGC CCC TAC GAG CAG CTG AAC GAC AGC AGC GAG

217 GAG GAG GAT GAG ATC GAC GGC CCC GCC GGC CAG GCT

253 GAG CCC GAC CGG GCC CAC TAC AAC ATC GTG ACC TTC

289 TGC TGC CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT

325 GAG CAA TTA AAT GAC AGC TCA GAG CAT TAC AAT ATT

361 GTA ACC TTT TGT TGC AAG TGT GAC TCT ACG CTT CGG

397 TTG TGC ATG GGC ACA CTA GGA ATT GTG TGC CCC ATC

433 TGT TCT CAG AAA CCA TAA

CCC GGG GGT ACC -----pmCG-50 Vektor-----3'

Sma I      KPN I

Klonierung erfolgte über PCR:

1.Sense Primer: 5' TCA CTG CAG GCG GCC GC CCC GCC GCC  
 (CPG Hin) ACC ATG CAC GGC 3'  
 Schnittstelle 5': Not I

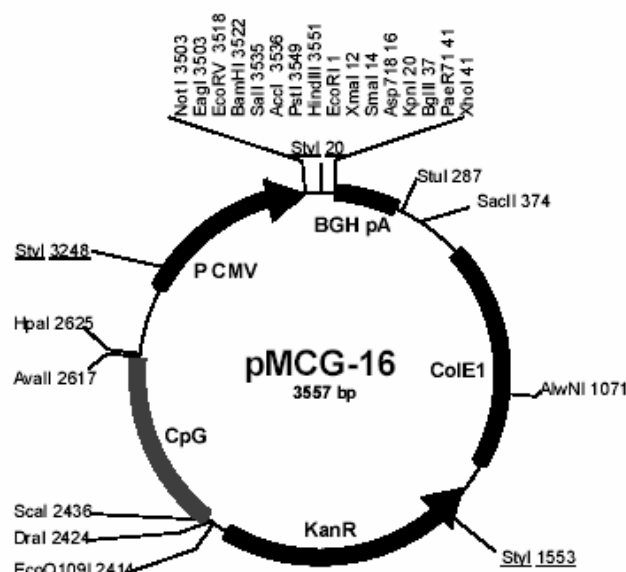
2.Antisense Primer: 5' TGA GGT ACC CCC GGG TTA TGG TTT CTG  
 (CPG Rück) AGA ACA GAT 3'  
 Schnittstelle 3': KPN I

Bezeichnung: **CpG16-E7SH**

Name des Herstellers: Stefan Heymel  
 Datum: Mai 2004  
 Resistenz: Kanamycin  
 Bakterienstamm: DH5 $\alpha$   
 Ausgangsplasmid: Coley Pharma  
 Ottawa/Canada

## Klonierungsstrategie:

- Insertlänge: 483bp
- Insert: 16 E7SH
- Produkt: rearrangiertes HPV Onkogen
- Promotor: CMV
- Nukleotidsequenz - Insert:



Not I  
↓

Kozak

5'-----pmCG-16 Vektor-----GCG GCC GC CCC GCC GCC ACC

1 ATG CAC GGC GAC ACC CCC ACC CTG CAC GAG TAC ATG

37 CTG GAC CTG CAG CCC GAG ACC ACC GAC CTG TAC TGC

73 ATC TGC AGC CAG AAA CCC AAG TGC GAC AGC ACC CTG

109 CGG CTG TGC GTG CAG AGC ACC CAC GTG GAC ATC CGG

145 ACC CTG GAG GAC CTG CTG ATG GGC ACC CTG GGC ATC

181 GTG TGC CCC TAC GAG CAG CTG AAC GAC AGC AGC GAG

217 GAG GAG GAT GAG ATC GAC GGC CCC GCC GGC CAG GCT

253 GAG CCC GAC CGG GCC CAC TAC AAC ATC GTG ACC TTC

289 TGC TGC CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT

325 GAG CAA TTA AAT GAC AGC TCA GAG CAT TAC AAT ATT

361 GTA ACC TTT TGT TGC AAG TGT GAC TCT ACG CTT CGG

397 TTG TGC ATG GGC ACA CTA GGA ATT GTG TGC CCC ATC

434 TGT TCT CAG AAA CCA TAA

CCC GGG GGT ACC -----pmCG-16 Vektor-----3'

Sma I                      ↑  
KPN I

Klonierung erfolgte über PCR:

1.Sense Primer: 5' TCA CTG CAG GCG GCC GC CCC GCC GCC  
 (CPG Hin) ACC ATG CAC GGC 3'  
 Schnittstelle 5': Not I

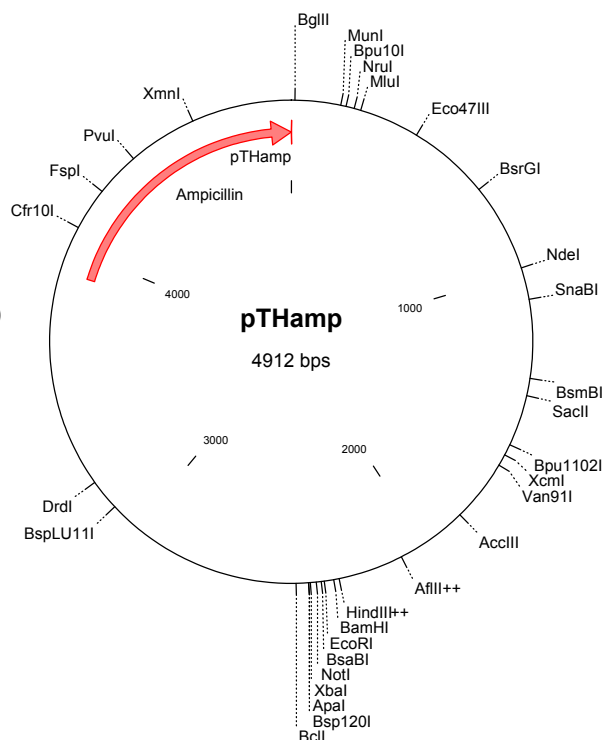
2.Antisense Primer: 5' TGA GGT ACC CCC GGG TTA TGG TTT CTG  
 (CPG Rück) AGA ACA GAT 3'  
 Schnittstelle 3': KPN I

Bezeichnung: **pTHamp-IL-2**

Name des Herstellers: Stefan Heymel  
 Datum: Mai 2004  
 Resistenz: Ampizillin  
 Bakterienstamm: DH5 $\alpha$   
 Ausgangsplasmid: pNGVL3-mIL-2  
 (1174), (NIH  
 Washington USA)

## Klonierungsstrategie:

- Insertlänge: 557bp
- Insert: IL-2
- Produkt: adjuvantes Zytokin
- Promotor: CMV
- Nukleotidsequenz - Insert:



**Bam HI**  
 ↓      **Sma I**      **Hind III**      **KOZAK**

5'-----pTHamp-Vektor---GGA TCC CCC GGG AAG CTT CCC GCC GCC ACC

1 ATG TAC AGC ATG CAG CTC GCA TCC TGT GTC ACA TTG ACA CTT GTG

46 CTC CTT GTC AAC AGC GCA CCC ACT TCA AGC TCC ACT TCA AGC TCT

91 ACA GCG GAA GCA CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG

139 CAG CAC CTG GAG CAG CTG TTG ATG GAC CTA CAG GAG CTC CTG AGC

184 AGG ATG GAG AAT TAC AGG AAC CTG AAA CTC CCC AGG ATG CTC ACC

229 TTC AAA TTT TAC TTG CCC AAG CAG GCC ACA GAA TTG AAA GAT CTT

274 CAG TGC CTA GAA GAT GAA CTT GGA CCT CTG CGG CAT GTT CTG GAT

319 TTG ACT CAA AGC AAA AGC TTT CAA TTG GAA GAT GCT GAG AAT TTC

364 ATC AGC AAT ATC AGA GTA ACT GTT GTA AAA CTA AAG GGC TCT GAC

409 AAC ACA TTT GAG TGC CAA TTC GAT GAT GAG TCA GCA ACT GTG GTG

454 GAC TTT CTG AGG AGA TGG ATA GCC TTC TGT CAA AGC ATC ATC TCA

499 ACA AGC CCT CAA TAA TAA CTG CAG TCT AGA-----pTHamp-Vektor---3'

Pst I      ↑  
             Xba I

Klonierung erfolgte über PCR:

1.Sense Primer: 5' TAT GC GGC CGC GGA TCC CCC GGG AAG CTT  
 (mIL-2 Hin) CCC GCC GCC ACC ATC TAC AGC ATG CAG CTC GCA  
 3'

Schnittstelle 5': Bam HI

2.Antisense Primer: 5' ATA GAA TTC CTC GAG TCT AGA CTG CAG  
 (mIL-2 Rück) TTA TTA TTG AGG GCT TGT TGA GAT 3'

Schnittstelle 3': Xba I

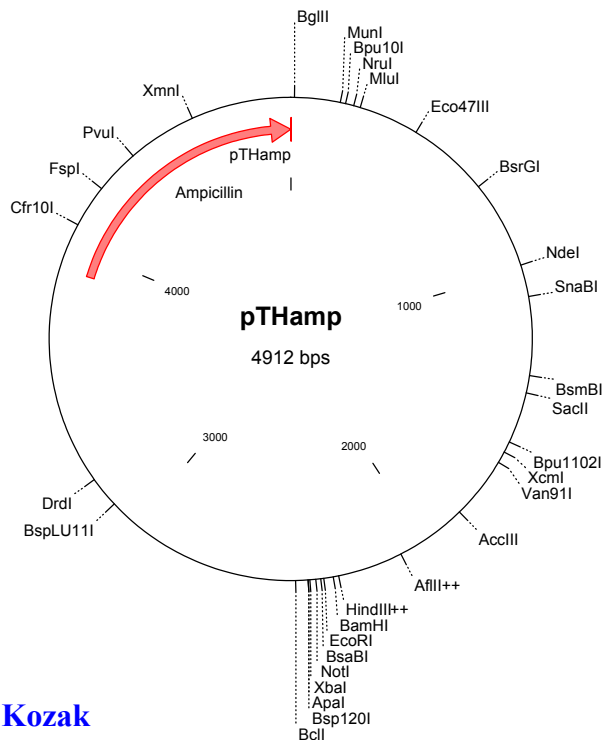


Bezeichnung: **pTHamp-GM-CSF**

Name des Herstellers: Stefan Heymel  
 Datum: Mai 2004  
 Resistenz: Ampizillin  
 Bakterienstamm: DH5 $\alpha$   
 Ausgangsplasmid: unbekannt  
 (NIH Washington USA)

## Klonierungsstrategie:

- Insertlänge: 458bp
- Insert: GM-CSF
- Produkt: adjuvantes Zytokin
- Promotor: CMV
- Nukleotidsequenz - Insert:



Hind III  
↓  
Kozak

5'-----pTHamp-Vektor----**AAG CTT CCC GCC GCC ACC**

1    ATG TGG CTG CAG AAT TTA CTT TTC CTG GGC ATT GTG GTC TAC

43    AGC CTC TCA GCA CCC ACC CGC TCA CCC ATC ACT GTC ACC CGG

85    CCT TGG AAG CAT GTA GAG GCC ATC AAA GAA GCC CTG AAC CTC

127   CTG GAT GAC ATG CCT GTC ACG TTG AAT GAA GAG GTA GAA GTC

169   GTC TCT AAC GAG TTC TCC TTC AAG AAG CTA ACA TGT GTG CAG

211   ACC CGC CTG AAG ATA TTC GAG CAG GGT CTA CGG GGC AAT TTC

253   ACC AAA CTC AAG GGC GCC TT G AAC ATG ACA GCC AGC TAC TAC

295   CAG ACA TAC TGC CCC CCA ACT CCG GAA ACG GAC TGT GAA ACA

337   CAA GTT ACC ACC TAT GCG GAT TTC ATA GAC AGC CTT AAA ACC

379   TTT CTG ACT GAT ATC CCC TTT GAA TGC AAA AAA CCA GGC CAA

421   AAA TGA TAA **CTG CAG TCT AGA**-----pTHamp-Vektor-----3'

Pst I    ↑  
Xba I

Klonierung erfolgte über PCR:

1.Sense Primer: 5' TAT GC GGC CGC GGA TCC CCC GGG **AAG CTT**  
 (mGM-CSF Hin) CCC GCC GCC ACC ATG TGG CTG CAG AAT TTA CTT 3'  
 Schnittstelle 5': **Hind III**

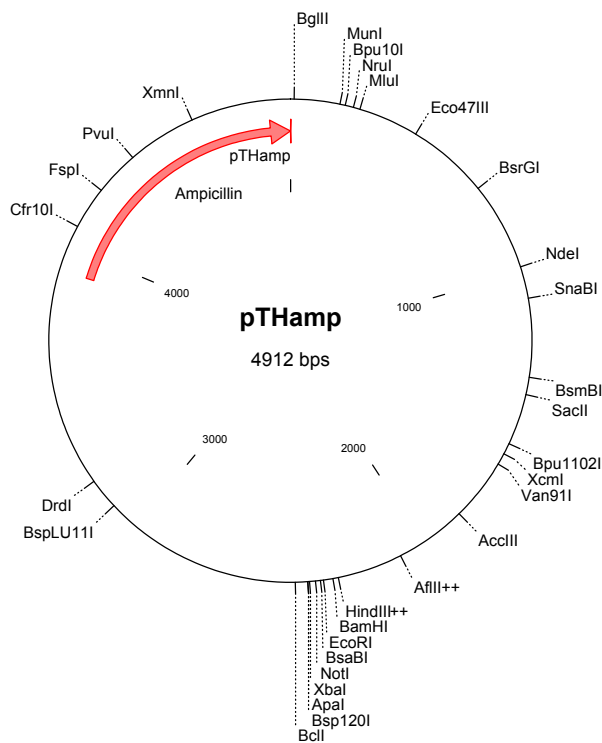
2.Antisense Primer: 5' ATA GAA TTC CTC GAG **TCT AGA** CTG CAG TTA  
 (mGM-CSF Rück) TCA TTT TTG GCC TGG TTT TTT 3'  
 Schnittstelle 3': **Xba I**

Bezeichnung: **pTHamp-IFN- $\gamma$** 

Name des Herstellers: Stefan Heymel  
 Datum: Mai 2004  
 Resistenz: Ampizillin  
 Bakterienstamm: DH5 $\alpha$   
 Ausgangsplasmid: pHBAPr-3P-neo  
 (Howard A. Young,  
 PH D. Lab of  
 Experimental  
 Immunology  
 NCI - Frederick)

## Klonierungsstrategie:

- Insertlänge: 503bp
- Insert: IFN- $\gamma$
- Produkt: adjuvantes Zytokin
- Promotor: CMV
- Nukleotidsequenz - Insert:



Hind III  
↓  
Kozak

5'-----pTHamp-Vektor-----**AAG CTT CCC GCC GCC ACC**

1 ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC TTG GCT TTG CAG CTC TTC CTC  
 43 ATG GCT GTT TCT GGC TGT TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA  
 85 AGC CTA GAA AGT CTG AAT AAC TAT TTT AAC TCA AGT GGC ATA  
 130 GAT GTG GAA GAA AAG AGT CTC TTC T TG GAT ATC TGG AGG  
 169 AAC TGG CAA AAG GAT GGT GAC ATG AAA ATC CTG CAG AGC  
 208 CAG ATT ATC TCT TTC TAC CTC AGA CTC TTT GAA GTC TTG AAA  
 250 GAC AAT CAG GCC ATC AGC AAC AAC ATA AGC GTC ATT GAA  
 289 TCA CAC CTG ATT ACT ACC TTC TTC AGC AAC AGC AAG GCG  
 328 AAA AAG GAT GCA TTC ATG AGT ATT GCC AAG TTT GAG GTC  
 367 AAC AAC CCA CAG GTC CAG CGC CAA GCA TTC AAT GAG CTC  
 406 ATC CGA GTG GTC CAC CAG CTG TTG CCG GAA TCC AGC CTC  
 445 AGG AAG CGG AAA AGG AGT CGC TGC TGA TAA

**CTG CAG TCT AGA**-----pTHamp-Vektor-----3'  
 Pst I ↑  
 Xba I

Klonierung erfolgte über PCR:

1.Sense Primer: 5' TAT GC GGC CGC GGA TCC CCC GGG **AAG CTT**  
 (IFN- $\gamma$  Hin) CCC GCC GCC ACC ATG AAC GCT ACA CAC TGC ATC  
 3'

Schnittstelle 5': **Hind III**

2.Antisense Primer: 5' ATA GAA TTC CTC GAG **TCT AGA** CTG CAG  
 (IFN- $\gamma$ Rück) TTA TCA GCA GCC ACT CCT TTT CCG 3'

Schnittstelle 3': **Xba I**

## 7.2 Materialien

### 7.2.1 Biologische Materialien

#### 7.2.1.1 Bakterienstamm (E. coli)

DH5 $\alpha$  supE44 $\square$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\square$ M15) hsdR17 ( $r_K^- m_K^+$ ) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 deoR

#### 7.2.1.2 Eukaryotische Zelllinien

2F11 Stabil E7-exprimierender Transfektanten-Klon = RMA-E7 (Speidel et al. 1997)

C3 Embryonale Mauszellen (H2<sup>b</sup>-Kontext), die mit dem kompletten HPV16-Genom transfiziert wurden (Feltkamp et al. 1993). Freundlicherweise von J. ter Schegget (Leiden University Medical Center) zur Verfügung gestellt.

RMA T-Lymphomzellen einer C57/BL6-Maus (Ljunggren und Karre 1985).

RMA-S Von der RMA-Zelllinie abgeleitete, TAP (transporter associated with antigen processing) defiziente Zelllinie. Es werden nur unbeladene K<sup>b</sup> und D<sup>b</sup> Moleküle an der Oberfläche präsentiert, die instabil sind. Durch externe Beladung mit „Fremd-Peptid“ von korrekter Größe und Sequenz können die MHC-I-Moleküle stabilisiert werden (Schumacher 1990).

#### 7.2.1.3 Mauslinien

Im Verlauf der DNA-Immunisierungs- sowie der Tumor-Reggressions-Experimente wurden Tiere des Mauseinzuchtstammes **C57/BL6** (H2<sup>b</sup>) verwendet. Die Lieferung der Tiere erfolgte durch die Firma Charles River (Sulzfeld, D). Die Haltung erfolgte unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Labor für Versuchstierkunde der FSU Jena.

### 7.2.2 Kulturmedien

#### 7.2.2.1 Bakterienkultur

LB-Medium 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl, ad 1000ml H<sub>2</sub>O (deionisiert), auf pH 7,5 mit NaOH-Lsg. einstellen, autoklavieren (20min, 121°C, 3bar), Lagerung bei 4°C

LB-Agarplatten 98,5% LB-Medium, 1,5% Bacto-Agar, autoklavieren (20min, 121°C, 3bar), Lösung auf etwa 50°C abkühlen lassen, Ampizillin oder Kanamycin hinzugeben, Platten gießen und bei 4°C lagern

Ampizillin Stammlösung = 100mg/ml, 1 $\mu$ l der Stammlösung/ml Bakterienmedium, Endkonzentration = 100 $\mu$ g/ml

Kanamycin Stammlösung = 30mg/ml, 1 $\mu$ l der Stammlösung/ml Bakterienmedium, Endkonzentration = 30 $\mu$ g/ml

Elektroporationsmedium 1ml 1M Glukose + 49ml LB-Medium

#### 7.2.2.2 Kultur eukaryotischer Zellen

$\alpha$ MEM 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 5x10<sup>-5</sup> M  $\beta$ -Mercaptoethanol

$\alpha$ MEM-ConA 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin,

	100µg/ml Streptomycin, 0,01mM β-Mercaptoethanol, 25mM Methyl-α-Mannopyranosid, 3,3% Concanavalin A-induzierter Rattenmilzzellüberstand als Quelle für IL-2. Bei Concanavalin A (ConA) handelt es sich um ein starkes T-Zell-Mitogen. Es wird aus der Schwertbohne ( <i>Canavalia ensiformis</i> ) gewonnen.
αMEM-IL-2	10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin, 0,01mM β-Mercaptoethanol, 25mM Methyl-α-Mannopyranosid, 1,2ml rekombinantes humanes IL-2
RPMI	5% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin
RPMI+	5% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin, 600 µg/ml Genitizin (G418)
RPMI-C3-Medium	10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penizillin, 100µg/ml Streptomycin, 0,1mg/ml Kanamycin, 0,01mM β-Mercaptoethanol, 0,8 mg/ml Genitizin (G418)
Kryokonservierung	20ml RPMI, 25ml FCS, 5ml DMSO, Lagerung bei 4°C
Das FCS wurde für 60 Minuten bei 56°C inaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Alle Ingredienzien, die der Supplementierung des Grundmediums dienten, wurden zuvor durch einen 0,2µm Sterilfilter gepresst.	
Trypsin/EDTA	0,125% EDTA + 0,125 Trypsin → in 1x PBS lösen
10 x PBS	80g NaCl, 20g KCl, 14,4g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 Liter <i>aqua bidest</i> , autoklavieren

## 7.2.3 Molekularbiologische, zellbiologische und immunologische Materialien

### 7.2.3.1 Plasmide

pTHamp	Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Thomas Hanke, Oxford, UK, zur Verfügung gestellt. Es hat eine Größe von 4912bp und basiert auf einem stark modifizierten pRC/CMV-Vektor (Hanke et al. 1998). Das pTHamp-Plasmid ist als Immunisierungsvektor in einer Version ohne Antibiotika-Resistenzgen für den Einsatz in klinischen Studien zugelassen. Es beinhaltet 4 CpG-Motive (Hanke und McMichael 2000).
CpG50/ CpG16	Diese beiden Vektoren wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceuticals (Wellesley, Ma, USA) zur Verfügung gestellt. Sie beinhalten 50 (CpG50) bzw. 16 (CpG16) CpG-Motive.

### 7.2.3.2 Synthetische Oligodesoxynukleotide (Primer)

#### Sequenzierung der neu generierten Expressionsvektoren, verwendete Primer:

Vorwärts-Primer	5' CAT GGG TCT TTT CTG CAG TC 3'
Rückwärts-Primer	5' CAG CGA GCT CTA GCA TTT AG 3'

Die Primer für die Generierung der adjuvanten Zytokine wurden von Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) hergestellt.

#### Primer zur Amplifikation von GAPDH (Kontrolle der cDNA-Synthese):

Sense Primer GAPDH-s:	5' GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG 3'
-----------------------	----------------------------------

**Antisense** Primer GAPDH-as: 5' CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC 3'

#### **Primer zum Transkriptionsnachweis der adjuvanten Gene mittels RT-PCR:**

**Sense** Primer GM-CSF\_F: 5' AGA CAT ACT GCC CCC CAA CTC 3'

**Sense** Primer IL-2\_F: 5' TGT GGT GGA CTT TCT GAG GAG A 3'

**Sense** Primer IFN- $\gamma$ \_F: 5' AGC TCA TCC GAG TGG TCC AC 3'

Für alle adjuvanten Gene konnte der gleiche **Antisense** Primer eingesetzt werden:

pTHamp-3'UTR\_R: 5' GCT GGC AAC TAG AAG GCA CAG 3'

#### **7.2.3.3 Materialien zur DNA-Auftrennung und Identifizierung im Agarosegel**

Laufpuffer (10x TBE)	108g Tris, 55g Borsäure, 9,5g EDTA, auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7,8 einstellen
6x Gelladepuffer	30% (v/v) Glycerin, 20mM Tris-HCL (pH 7,6), 2mM EDTA, 0,02% (w/v) Bromphenolblau und Xylenxyanol in deionisiertem Wasser
Ethidiumbromid (10mg/ml)	1g Ethidiumbromid, 100ml H <sub>2</sub> O, dunkel und bei 4°C lagern
DNA-Längenmarker	GeneRuler™DNA Smartladder, Eurogentec (Köln, D) (10, 8, 6, 5, 4, 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.4kb)

#### **7.2.3.4 Materialien für die Aufarbeitung von DNA**

CIA	Chloroform: Isoamylalkohol (24: 1)
Phenol/ CIA	50% Phenol, 50% CIA

#### **7.2.3.5 Plasmidschnellaufarbeitung/ Plasmidgroßaufarbeitung mittels Kit<sup>\*1</sup>**

##### **7.2.3.5.1 Minipräparation**

Lösung 1	20% Saccharose, 10mM Tris/HCL pH 8,0, 10mM EDTA, 50mM NaCl
Lösung 2	0,2N NaOH, 1% SDS
Lösung 3	3M Na-Acetat pH 5,2
TE-Puffer	10mM Tris/HCL pH 7,4, 1mM EDTA

##### **7.2.3.5.2 Maxipräparation mittels Kit**

Für die Aufarbeitung der DNA wurde der QIAGEN® Plasmid Kit (Hilden, D) verwendet.

Resuspensionspuffer (P1)	50mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A, Lagerung bei 2 bis 8°C
Lysispuffer (P2)	200mM NaOH, 1% SDS (w/v), Lagerung bei RT
Neutralisierungspuffer (P3)	3M Potassium acetate, auf pH 5,5 einstellen, Lagerung bei RT
Equilibrierungspuffer (QBT)	750mM NaCl, 50mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol (v/v), 0,15% Triton® X-100 (v/v), Lagerung bei RT
Waschpuffer (QC)	1M NaCl, 50mM MOPS pH 7,0, 15% Isopropanol (v/v), Lagerung bei RT
Elutionspuffer (QF)	1,25M NaCl, 50mM Tris pH 8,5, 15% Isopropanol (v/v), Lagerung bei RT

### 7.2.3.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels Kit

Für die Aufarbeitung wurde das Qiaex II-DNA-Extraktions-Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Die Einzelkomponenten werden von der Firma Qiagen nicht angegeben.

### 7.2.3.7 Immunisierung

Kardiotoxin	Führt zu einem inflammatorischen Prozess im Muskelgewebe und besitzt aufgrund dieser Eigenschaft adjuvante Aktivität. Es wird aus der Schlange <i>Naja nigricollis</i> gewonnen und von der Firma Latoxan (Rosans, Frankreich) bezogen.
Isofluran Curamed	Ist ein Inhalationsnarkotikum mit dem Wirkstoff Isofluran. Es wurde zur Narkotisierung der Mäuse eingesetzt und mit Sauerstoff (2 Volumenprozent) gemischt (CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, D).

### 7.2.3.8 Isolierung der Milzzellen

ACT-Puffer	17mM Tris (pH 7,65), 160mM Ammoniumchlorid, Lösung auf pH 7,2 einstellen und autoklavieren.
------------	---

### 7.2.3.9 Elispot-Assay (Enzyme linked Immunospot Assay)

IFN- $\gamma$ -AK	Monoklonaler aufgereinigter Ratten anti-Maus IFN- $\gamma$ -AK, hergestellt von der Firma BD PharMingen (Heidelberg, D). Als Erst-AK (2 $\mu$ g/ml) im Elispot-Assay eingesetzt.
Biotin-IFN- $\gamma$ -AK	Monoklonaler und an Biotin gekoppelter Ratten anti-Maus IFN- $\gamma$ -AK der Firma BD PharMingen (Heidelberg, D). Als Zweit-AK (2 $\mu$ g/ml) im Elispot-Assay eingesetzt.
SAP	Streptavidin-Alkalin-Phosphatase von der Firma BD PharMingen (Heidelberg, D). Vor der Anwendung 1: 1 mit Glycerol verdünnt.
BCIP/NBT-Substrat	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat/ Nitro Blau Tetrazolium, flüssiges Substrat-System zur Entwicklung der Elispot-Platten, Firma Sigma (Deisenhofen, D), unverdünnt eingesetzt.

### 7.2.3.10 <sup>51</sup>Chrom-Freisetzungs-Assay (Zytotoxizitätstest)

Tritonlösung	10% Triton X-100, in PBS und steril filtrieren
--------------	--

### 7.2.3.11 Western Blot-Analyse der zellulär exprimierten adjuvanten Gene

Trenngel (15%)	2,5ml 30% Acrylamid-Lösung, 1,3ml 4x Tris-HCL/SDS pH 8,8, 1,2ml H <sub>2</sub> O, 50 $\mu$ l 10% APS, 5 $\mu$ l TEMED
Sammelgel	260 $\mu$ l 30% Acrylamid-Lösung, 500 $\mu$ l 4x Tris-HCL/SDS pH 6,8, 1,22ml H <sub>2</sub> O, 20 $\mu$ l 10% APS, 2 $\mu$ l TEMED
4x Tris-HCL/SDS (pH 6,8)	6,05g Tris, 40ml H <sub>2</sub> O, pH 6,8 einstellen und auf 100 ml auffüllen, 0,4g SDS zugeben, Lagerung bei 4°C
4x Tris-HCL/SDS (pH 8,8)	91g Tris, 300ml H <sub>2</sub> O, pH 8,8 einstellen und auf 500 ml auffüllen, 2g SDS zugeben, Lagerung bei 4°C
6x SDS-Probenpuffer	7ml 4x Tris-HCL/SDS pH 6,8, 3ml Glycerin, 1g SDS, 0,93g DTT, 1,2mg Bromphenolblau, Lagerung bei -20°C

5x SDS-Laufpuffer	15g Tris, 72g Glycin, 5g SDS, lösen und auf 1000 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen, Lagerung bei 4°C
Transfer-Puffer	200mM Glycin, 25mM Tris, 20% (w/v) Methanol
1x TBST (Waschlsg.)	1x TBS, 0,1% (w/v) Tween 20
10x TBS	20mM Tris, 500mM NaCl, auf pH 7,6 einstellen
Erst-AK IL-2	monoklonaler Anti-Interleukin-2 Antikörper (IgG <sub>2</sub> rat-anti-mouse), der Firma BD Biosciences PharMingen (Heidelberg, D), Dosierung: 4µg/ml
Positiv Probe IL-2	murines rekombinantes IL-2 der Firma Biological (Massachusetts, USA), Dosierung: 0,1mg/ml
Erst-AK IFN-γ	monoklonaler Anti-IFN-γ-Antikörper (IgG <sub>1</sub> rat-anti-mouse) der Firma BD Biosciences PharMingen (Heidelberg, D), Dosierung: 5µg/ml
Positiv Probe IFN-γ	murines rekombinantes IFN-γ der Firma Chemicon, Dosierung: 1mg/ml
Erst-AK GM-CSF	monoklonaler Anti-GM-CSF-Antikörper (IgG <sub>2</sub> rat-anti-mouse) der Firma Biomol (Hamburg, D), Dosierung: 3µg/ml
Positiv Probe GM-CSF	murines rekombinantes GM-CSF der Firma Immunotools, (Friesoythe, D), Dosierung: 10µg/µl
Zweit-AK IL-2, IFN-γ, GM-CSF	an Peroxidase gekoppelter rabbit anti-rat-IgG-Antikörper der Firma Sigma Aldrich (Steinheim, D), Dosierung: 4µg/ml
Erst-AK-Lösung	5% Milchpulver, in 1x TBST lösen + 1. AK
Zweit-AK-Lösung	5% Milchpulver, in 1x TBST lösen + 2. AK
Protein-Marker (1)	PeqGOLD Protein-Marker III (Prestained) von PeqLab, Biotechnologie GmbH (Erlangen, D). 6 Banden (122, 79, 47, 33, 24, 20 kDa)
Protein-Marker (2)	Precision Plus Protein Prestained Standards von BioRad (Hercules, CA, USA). 10 Banden (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kDa)
Block-Puffer	5% Milchpulver, in 1x TBST
Ponceau-Rot	2% in 3% Trichloressigsäure

### 7.2.3.12 Coomassiefärbung von Proteingelen

Coomassie-Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant blue G250, in H <sub>2</sub> O
Coomassie-Entfärbelösung	10% (v/v) Methanol, 7,5% (v/v) Essigsäure, in H <sub>2</sub> O

### 7.2.3.13 Materialien für RNA-Extraktion

#### 7.2.3.13.1 RNA-Extraktion mit TRIzol® Reagent

DEPC-aqua bidest 1ml DEPC, ad 1000ml H<sub>2</sub>O, 2h rühren und autoklavieren

#### 7.2.3.13.2 RNA-Extraktion mittels QIAamp® RNA Blood Mini Kit

Für die Extraktion der RNA aus Zellen wurde der QIAamp® RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, D) verwendet. Die Pufferzusammensetzung ist im Handbuch nicht beschrieben.

### 7.2.3.14 Materialien für Northern Blot

20x MOPS	400mM MOPS, 100mM Natriumacetat, 20mM EDTA mit NaOH auf pH 7,0 einstellen, steril filtrieren (0,2 µm)
RNA-Probenpuffer	50µl 20x MOPS, 350µl Formaldehyd, 1000µl Formamid
RNA-Gelladungspuffer	50% Glycerol, 1mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenecyanol FF
RNA-Agarosegel	1% Agarose, in 1x MOPS
RNA-Laufpuffer	1x MOPS
20x SSC	175,3g NaCl, 88,2g Na-Citrat, ad 1000ml H <sub>2</sub> O, pH 7,0 einstellen und autoklavieren
Random Primed DNA Labelling Kit	zur Markierung von DNA mit Hilfe von „random“-Oligonukleotiden als Primer von Boehringer Mannheim (Mannheim, D). bestehend aus:
Kontroll DNA:	20µl λ-DNA, 12,5µg/ml
dATP, dCTP, dGTP und dTTP:	je 50µl 0,5mM, in Tris-Puffer
Reaktionsgemisch:	100µl Hexanukleotidgemisch in 10fach konzentriertem Reaktionspuffer
Klenow-Enzym:	50µl, 2Einheiten/µl, in Glycerin 50% (v/v)
Quick Spin™ Columns	G-50 Sephadex Columns zur Aufreinigung von radioaktiv markierter DNA. G-50 Sephadex wird in STE-Puffer gelöst (10mM Tris (pH 8,0), 1mM EDTA, 100mM NaCl).
RNA-Ladder	Die 0,24-9,5kb RNA-Leiter wurde von der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Es wurden 3µg pro Bande eingesetzt. Auf dem Gel wurden 6 Banden sichtbar (9,49; 7,46; 4,40; 2,37; 1,35; 0,24 kb)
t-RNA (10mg/ml)	bezogen von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, D)
50x Denhardt's	5g Ficoll, 5g Polyvinylpyrrolidone, 5g Rinderserumalbumin ad 500ml H <sub>2</sub> O
NAPP (1M, pH 6,4)	25,5ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 74,5ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1000ml H <sub>2</sub> O

### 7.2.3.15 Transfektion

METAFECTENE™	Hocheffizientes Transfektionsreagenz für Säugerzellen von der Firma Biontex (München, D).
--------------	---

### 7.2.3.16 Chemisch kompetente Zellen

Lösung 1	20ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 1ml 1M Tris pH 7,5, ad 200ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren
Lösung 2	20ml 1M CaCl <sub>2</sub> , 1ml 1M Tris pH 7,4, ad 200ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren
Lösung 3	1,4ml 87% Glycerin (steril), 1ml 1M CaCl <sub>2</sub> , 50µl 1M Tris pH 7,4, Lösungen vor Gebrauch ü.N. bei 4°C lagern

### 7.2.3.17 Enzyme

Restriktionsenzyme/ 10x Puffer	New England Biolabs (Schwalbach, D)
--------------------------------	-------------------------------------



Kälberdarmphosphatase (CIP)	New England Biolabs (Schwalbach, D)
T4-DNA Ligase	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Herkulase-DNA-Polymerase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Expand High Fidelity PCR	System Roche (Penzberg, D)
RNase A	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptavidin-Alkaline-Phosphatase	BD PharMingen (Heidelberg, D)
Kleenow-Enzym	Boehringer Mannheim (Mannheim, D)
Ampli Taq Gold	Roche (Branchburg, NJ, USA)
RNase-OUT-Inhibitor	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Superscript II RNase H Reverse	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Transkriptase	

### 7.2.3.18 Geräte

Autoklav	Münchner Medizin Mechanik GmbH (München, D)
Bakterienschüttler GFL® 3015	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
BAS SR Imaging Plate (IP)	Fujifilm (Japan)
Counter-Messgerät (QC-4000/XER), Cyclor (RT)	Bioscan (Washington, DC, USA)
Einfriersystem	Nalge Nunc International
Eismaschine	„Chrystal Tips“ ICE Systems (New York, USA)
Elektrophoresekammern	Boehringer Ingelheim (D)
Elispot-Reader	Carl-Zeiss Vision GmbH (Oberkochen, D)
(KS Elispot Release 4.3)	
Expositionskassetten (X-OMAT)	Kodak (Stuttgart, D)
Feinwaage BP121S	Sartorius AG (Göttingen, D)
Geldokumentationsanlage	Sony (Tokyo, Japan)
(Video Graphic Printer UP-890CE)	
Geltrocknungsrahmen	BioRad (München, D)
Gene Pulser® II	BioRad (Hercules, USA)
Elektroporationssystem	
Heizblock	Eppendorf (Hamburg, D)
Hybridisierungsofen	Heraeus (Gera, D)
Inkubator	Forma Scientific, Inc. (Marjetta, Ohio, USA)
Laborwaage BL 3100	Sartorius AG (Göttingen, D)
Laminarwerkbank (SteriGrad)	The Baker Company (Sanford, USA)
Lichtmikroskop	Carl Zeiss (Jena, D)
Magnetrührer RCT Basic	IKALabortechnik (Staufen, D)
Mastercycler gradient	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Mikrowelle	Panasonic (Hamburg, D)
pH-Meter (pH526)	WTW (Weilheim, D)
Pipettierhilfe	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Schüttelwasserbad (GFL® 1083)	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Semi-Dry-Gerät	Schleicher&Schuell (Schwerte, D)
Spektralphotometer (Spectronic Genesys 2)	Milton Roy (Rochster, USA)
Sterile Werkbank (SG-400E)	The Baker Company (Stanford, Maine, USA)
Stickstofftank	Messer Grisheim GmbH (Krefeld, D)
Thermocycler comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifuge (5417R)	Eppendorf (Hamburg, D)
Ultrazentrifuge (Optima XL-100)	Beckman (Palo Alto, USA)
UV-Kontaktlampe (Chroma 42)	Vetter (Wiesloch, D)

Vakuum Regulator/ Blotter	BioRad (Hercules, CA, USA)
Vaporizer (Medimorph System)	MLW Medizintechnik (Leipzig, D)
Vortexgenie 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Westernblottapparat	BioRad (München, D)
(Trans-Blot®SD)	
Zählkammer (Neubauer)	Brand (Melsungen, D)
Zentrifugen (Minifuge GL & Megafuge 1.0R)	Heraeus Christ GmbH (Osterode, D)

### 7.2.3.19 Verbrauchsmaterialien

Cellophane Support	BioRad (München, D)
Deckgläschen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Einfrierröhrchen 2ml	Greiner (Solingen, D)
Einmalhandschuhe SensiClean®	Ansell (Melaka, Malaysia)
Elektroporationsküvetten	BioRad (Hercules, CA, USA)
Elispot-Platten	Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml/ 2ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Filterpapier (Whatmann 3MM)	Schleicher & Schuell (Schwerte, D)
Frischhaltefolie	Papstar (D)
Hyperfilm MP	Amersham (Braunschweig, D)
Immobilon™-P Transfer Membran	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
Kanülen steril (0,3x13 mm)	Becton Dickinson (Drogheda, IR)
Kodak-Röntgenfilme X-OMAT	Eastman Kodak Company (Rochester, NY, USA)
Kryokonservierungs-Röhrchen	Greiner (Solingen, D)
6, 24, 96-Lochplatten	Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Nylonmembran	Roche (Mannheim, D)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Parafilm „M“™	American National Can (Greenwich, CT, USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Petrischalen	Greiner BIO-ONE GmbH (Frickenhausen, D)
Pipetten (2, 5, 10ml)	Greiner (Solingen, D)
Pipettenspitzen	Brand (D)
Plastikküvetten (1,5ml)	Brand (D)
Plastikröhrchen (15ml/ 50ml)	Greiner BIO-ONE GmbH (Frickenhausen, D)
Sterilfilter 0,2µm (500ml)	Corning Incorporated (Corning, NY, USA)
Sterilfilter 0,2µm (10ml)	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zellkultur-Flaschen mit Filter (25, 75, 125cm <sup>2</sup> )	BD Biosciences (Bedford, MA, USA)
Zellkulturschalen (6 bzw. 10cm)	Becton Dickinson Labware (Franklin Lakes, NJ, USA)

### 7.2.3.20 Chemikalien

Acrylamidlösung 30% (w/v)	AppliChem (Darmstadt, D)
Agarose	Boehringer (Mannheim, D)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Deisenhofen, D)
Ampizillin	Sigma (Deisenhofen, D)
Aqua dest./bidest	Labor
Bacto-Agar-Trypton-Hefeextrakt	Remel (Augsburg, D)
Bradford-Reagenz	BioRad (München, D)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D)

BSA (Bovines Serum Albumin)	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen, D)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Coomassie Brilliant G250 Blau	BioRad (München, D)
D(+) Glukose	Sigma (Deisenhofen, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
dNTPs (je 10µmol)	Roche (Penzberg, D)
Drying Solution	BioRad (München, D)
ECL™ Westernblotting	Amersham (Braunschweig, D)
Detection Reagents	
Ethanol 96%	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethanol 80% zum Desinfizieren	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken, D)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, D)
FCS (fötales Kälberserum)	Sigma (Deisenhofen, D)
Ficoll-Plaque plus	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Formaldehydlösung mind. 37%	Merck (Darmstadt, D)
Formamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
GeneRuler™ DNA Smartladder	Eurogentech (Darmstadt, D)
Genetizin (G418) - Sulphate	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Glycerol min. 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Harnstoff	Sigma (Deisenhofen, D)
HEPES	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, D)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, D)
β-Mercaptoethanol	Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH)
Methanol	Sigma (Deisenhofen, D)
Methyl-α-Mannopyranosid(αMM)	Sigma (Deisenhofen, D)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Deisenhofen, D)
RNA-Ladder (0,24-9,5kb)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Penicillin/Streptomycin Solution	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Phenol	Merck (Darmstadt, D)
Proteinmarker Precision	BioRad (Hercules, CA, USA)
Plus Protein™	
RPMI 1640 (+ Glutamax)	GibcoBRL (Eggenstein, D)
TEMED	Merck (Darmstadt, D)
Tris	Roth (Karlsruhe, D)
Triton X-100	Merck (Darmstadt, D)
TRIzol® Reagent	GibcoBRL (Eggenstein, D)
Trypanblau 0,4%	Sigma (Deisenhofen, D)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, D)
Wachs Chill-out 14™	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf, D)

### 7.2.3.21 Radioisotope

α <sup>32</sup> PdATP	Perkin Elmer (Boston, USA)
-----------------------	----------------------------

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. P. Öhlschläger für die Überlassung des Themas sowie die umfassende Unterstützung bei Planung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst für die Möglichkeit, dieses Thema im Labor für „Gynäkologische Molekularbiologie“ bearbeiten zu können und für sein Interesse und Engagement am Fertigstellen dieser Arbeit recht herzlich bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für „Gynäkologische Molekularbiologie“ für die rege Unterstützung und die guten Ratschläge während meiner täglichen Laborarbeit.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Versuchstierkunde. Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Prof. Schubert, Frau Dobermann und Frau Kosmehl für die gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung während der Tierexperimente bedanken.

Nicht zuletzt sei auch meiner Familie und meiner Freundin gedankt für die moralische und praktische Unterstützung während meines Studiums, ohne welche die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. rer. nat. P. Öhlschläger und Herr Prof. Dr. rer. nat. M. Dürst,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 05. Juli 2006

Stefan Heymel

## **Lebenslauf**

Name: Stefan Heymel  
Adresse: Löbichauer Straße 11  
07749 Jena  
Geburtstag: 14.01.1980  
Geburtsort: Schmalkalden  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulausbildung:**

- 1986 - 1990 Staatliche Grundschule Breitung
- 1990 - 1998 Werratalgymnasium Schwallungen

### **Wehrdienst:**

- 11/1998 - 08/1999 Wehrdienst als Sanitäter

### **Studium:**

- 10/ 1999 Beginn Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 08/ 2001 Ärztliche Vorprüfung
- 09/ 2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 04/ 2004 Beginn der Promotionsarbeit im Labor für „Gynäkologische Molekularbiologie“
- 04/ 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 04/ 2005 - 03/ 2006 Praktisches Jahr
- 06/ 2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Jena, im Juli 2006

Stefan Heymel